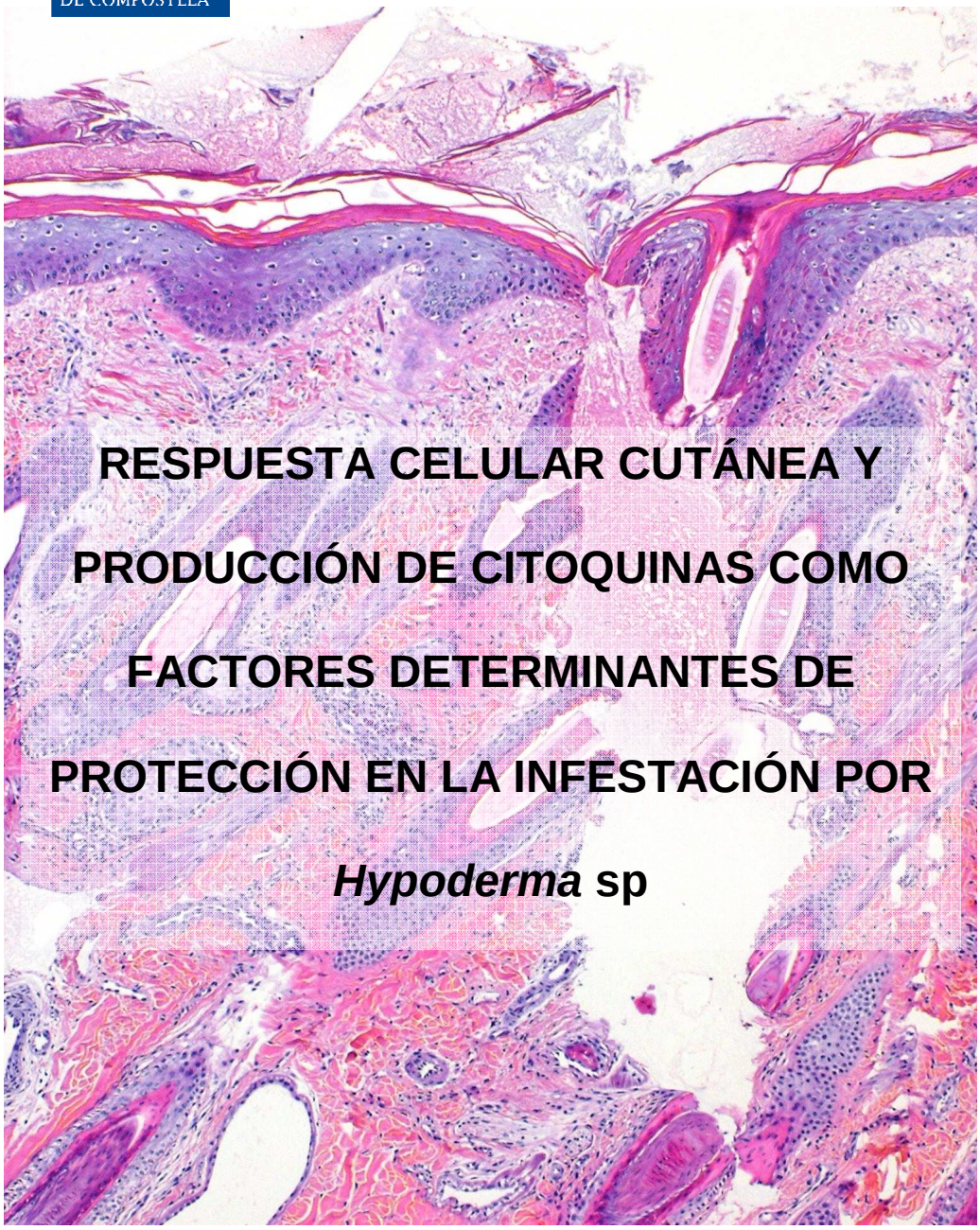
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA LUGO



RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS COMO FACTORES DETERMINANTES DE PROTECCIÓN EN LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma* sp

Memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria **D. Vicente Dacal Rivas** para optar al Título de Doctor.

Lugo, julio de 2009

D. PABLO DÍEZ BAÑOS, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

D. CEFERINO M. LÓPEZ SÁNDEZ, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

DÑA ROSARIO PANADERO FONTÁN, Profesora Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **"RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS COMO FACTORES DETERMINANTES DE PROTECCIÓN EN LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma* sp."**, que presenta el licenciado en Veterinaria D. VICENTE DACAL RIVAS para optar al Título de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión, reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 30 de junio de 2009.

Pablo Díez Baños Ceferino M. López Sández Rosario Panadero Fontán

Una parte de los resultados obtenidos en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

1. Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: oestridae) larvae. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, 108 (2005): 285-294.

2. Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. ***Medical and Veterinary Entomology****,* 21 (2007): 225-230.

3. Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: *in vitro* effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. ***Parasite Immunology***, 31 (2009): 72-77.

4. Local and systemic cytokine responses during larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, 108 (2009): 285-294.

Financiación

Este trabajo se ha realizado mediante una **Beca del Programa Nacional de Formación de profesorado Universitario** (FPU) concedida a D. Vicente Dacal Rivas por el Ministerio de Educación y Ciencia (01/10/2007-30/09/2009) y con el soporte económico de los proyectos de investigación:

Hipodermosis bovina: respuesta inmunitaria celular y citoquinas como factores determinantes de protección. (AGL-2004-01827). Ministerio de Educación y Ciencia (2004-2007). Investigador principal: Pablo Díez Baños.

Ayuda/Incentivo para el proyecto "**Hipodermosis bovina: respuesta inmunitaria celular y citoquinas como factores determinantes de protección".** (Incentivo PGIDIT05PXIC26101PN). Dirección Xeral de I+D. Xunta de Galicia (2005-2008). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta, han contribuido a la realización de la presente Tesis Doctoral y en especial:

A mis directores, que han sido mucho más que eso, apoyándome en todo lo que he necesitado, Catedrático Prof. Dr. Pablo Díez Baños por aportarme todos sus conocimientos y experiencia siempre que lo he necesitado, Profa. Dra. Rosario Panadero Fontán por haberme propuesto el tema de esta Tesis y por guiar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y Prof. Dr. Ceferino López Sández por su constancia, dedicación y sus conocimientos informáticos, a pesar de no instalar Ubuntu, porque al final “Windows funciona y todo”.

A la Catedrática Profa. Dra. Patrocinio Morrondo Pelayo por estar siempre pendiente de la elaboración de esta memoria y al final uno de los “niños” va a ser Doctor.

A la Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade Fernández, al Prof. Dr. Adolfo Paz Silva y al Dr. José Luis Suárez por su ayuda, compañerismo y por los buenos momentos que hemos pasado.

Al Catedrático Prof. Dr. Juan Francisco García Marín por poner a mi disposición todos los medios necesarios del laboratorio de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de León.

Al Catedrático Prof. Dr. Valentín Pérez Pérez, por estar siempre pendiente desde mi llegada a León y por su dedicación y valiosos consejos, sin los cuales una parte importante de este trabajo no habría salido adelante.

Al pronto Doctor Luis Vázquez Sande, más que un compañero, un muy buen amigo que ha colaborado enormemente en la realización de este trabajo. Sin su amistad, alegría, ilusión y consejos desinteresados en los buenos y malos momentos, a lo largo de todos los años de Licenciatura y Tercer Ciclo se haría todo mucho más difícil. Por su apoyo y ayuda en el trabajo y en el ámbito personal donde ha sido un pilar importante. Estoy seguro de que le esperan muchos éxitos.

A la Dra. Marisol Arias por las risas y buenas etapas dentro y fuera del Departamento, así como por su buen humor, largas charlas y gran personalidad.

Al recién Ayudante Doctor Pablo Díaz por sus consejos y ratos compartidos en el despacho durante todos estos años.

Al Dr. José Pedreira García, por prestarme su ayuda, por su energía y amistad, así como por los grandiosos momentos de humor en el laboratorio.

Al "infeccioparasitólogo" Pato ya que fue un estímulo final para la realización de esta Tesis con sus comentarios y forma de ver la vida, así como los buenos momentos y anécdotas compartidos en los muestreos ovinos y de rumiantes silvestres.

A Sandrita por su forma auténtica de ser, su voz desapercibida, su alegría y risa contagiosa así como sus divertidas historias.

A los demás compañeros del Departamento: Javier Cortiñas, Pier, Rubén, Estefa, Iván, Noelia, Sara y Alberto. A todos gracias por su simpatía, ayuda y por favorecer la creación de un ambiente tan agradable.

A toda la gente que pasó por el departamento: Dra. Carmen Lomba, Antonio, Berta, Maite, María (Komenencias), a los integrantes de la Clínica Aceña de Olga: Dr. Ángel Romasanta, Adriana y Patricia.

A Elena, que además de realizar la parte administrativa necesaria para que esta Tesis Doctoral saliera a la luz, siempre se preocupó por su realización.

A los integrantes del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de León: María, Julio, Miguel, Carlos, Jorge, Sonia, Gloria, Silvia, Chema y de forma muy especial a Laetitia por los inolvidables regresos a casa, comidas y comentarios (Sí tía). Sin ella mi estancia en León sería más aburrida, ya que a pesar de sus múltiples ocupaciones con los corderos estuvo siempre a mi lado.

Al Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de León, y especialmente a la Dra. Profa. Natividad Díez Baños por la maravillosa hospitalidad durante mi estancia.

A mis amigos, en especial a Marcos Fernández y futuros compañeros por su continuo interés y comprensión.

A mi familia, por su apoyo perseverante, por la paciencia que han tenido en el transcurso de mi Licenciatura en Veterinaria y en la realización de este trabajo, dedicado de manera especial a ellos.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN..... 1

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 7

2.1.- AGENTE ETIOLÓGICO 9

2.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE *H. bovis* E *H. lineatum*..... 9

2.2.- CICLO BIOLÓGICO..... 15

2.2.1.- BIOLOGÍA 15

2.2.2.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE *Hypoderma* spp. 20

2.2.2.1.- FACTORES EXTRÍNSECOS O MEDIOAMBIENTALES 20

2.2.2.2.- FACTORES INTRÍNSECOS O DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR 25

2.3.- PATOGENIA..... 27

2.4.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....35

2.5.- LESIONES 37

2.5.1.- FASE DE INVASIÓN CUTÁNEA.....37

2.5.2.- FASE DE MIGRACIÓN Y REPOSO.....37

2.5.3.- FASE SUBCUTÁNEA EN EL DORSO 40

2.6.- EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO 42

2.6.1.- LA PIEL COMO ÓRGANO DEL SISTEMA INMUNE..... 42

2.6.2.- RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA FRENTE A UNA INFESTACIÓN POR ECTOPARÁSITOS 46

2.7.- RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Hypoderma* spp. 54

2.7.1.- RESPUESTA INMUNE NATURAL.....54

2.7.2.- RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA 54

2.7.2.1.- RESPUESTA INMUNE CELULAR.....55

2.7.2.2.- RESPUESTA INMUNE HUMORAL 60

2.8.- LAS CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS..... 66

3.- ENSAYO 1: RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA EN MUESTRAS INCLUIDAS EN PARAFINA DE GANADO VACUNO INFESTADO EXPERIMENTALMENTE POR *Hypoderma lineatum*..... 77

3.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS 79

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS..... 83

3.2.1.- ANIMALES E INFESTACIONES EXPERIMENTALES 85

3.2.2.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS DÉRMICAS..... 87

3.2.3.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO 88

3.2.4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO..... 91

3.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 100

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 101

3.3.1.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO 103

3.3.1.1.- VALORACIÓN DE LOS INFILTRADOS LINFOPLASMOCITARIOS.....103

3.3.1.2.- RESPUESTA EOSINOFÍLICA 108

3.3.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....111

3.3.2.1.- LINFOCITOS T.....111

3.3.2.2.- LINFOCITOS B 114

3.3.2.3.- CÉLULAS PLASMÁTICAS.....117

3.3.2.4.- RELACIONES ENTRE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES.....119

3.3.2.4.1.- RELACIÓN LINFOCITOS T/LINFOCITOS B.....119

3.3.2.4.2.- RELACIÓN LINFOCITOS B/CÉLULAS PLASMÁTICAS.....123

4.- ENSAYO 2: RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN MUESTRAS CONGELADAS EN GANADO VACUNO INFESTADO EXPERIMENTALMENTE POR *Hypoderma lineatum* 127

4.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS 129

4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS..... 133

4.2.1.- ANIMALES E INFESTACIONES EXPERIMENTALES 135

4.2.2.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS 136

4.2.3.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO 137

4.2.4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO 138

4.2.5.- TÉCNICA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE INTERLEUQUINAS EN SUERO 142

4.2.5.1.- NORMALIZACIÓN DE LAS ABSORBANCIAS Y CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES..... 144

4.2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 146

4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 147

4.3.1.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO 149

4.3.1.1.- VALORACIÓN DE LOS INFILTRADOS LINFOPLASMOCITARIOS.....149

4.3.1.2.- RESPUESTA EOSINOFÍLICA 153

4.3.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO 156

4.3.2.1.- LINFOCITOS T.....156

4.3.2.2.- LINFOCITOS T CD4 159

4.3.2.3.- LINFOCITOS T CD8 161

4.3.2.4.- RELACIÓN LINFOCITOS T CD4/CD8.....164

4.3.2.5.- LINFOCITOS B 167

4.3.2.6.- MACRÓFAGOS 170

4.3.2.7.- CÉLULAS MHC TIPO II 171

4.3.3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS A NIVEL CUTÁNEO EN ANIMALES INFESTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Hypoderma lineatum* 174

4.3.3.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α (TNF-α).....174

4.3.3.2.- INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ) 176

4.3.3.3.- INTERLEUQUINA 10 (IL-10).....180

4.3.3.4.- INTERLEUQUINA 4 (IL-4).....183

4.3.3.5.- INTERLEUQUINA 12 (IL-12).....185

4.3.4.- NIVELES SÉRICOS DE CITOQUINAS DURANTE LAS FASES INICIALES DE LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma lineatum* 187

4.3.4.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α (TNF-α).....188

4.3.4.2.- INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ) 190

4.3.4.3.- INTERLEUQUINA 10 (IL-10).....192

4.3.4.4.- INTERLEUQUINA 4 (IL-4).....195

4.3.4.5.- INTERLEUQUINA 12 (IL-12).....196

4.3.5.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO..... 198

5.- CONCLUSIONES..... 201

6.- RESUMEN..... 205

7.- BIBLIOGRAFÍA..... 211

Introducción

Las larvas de *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) son parásitos obligados que migran y se alimentan de los tejidos del hospedador, dejando tras de sí importantes lesiones.

La importancia de la hipodermosis en nuestro país ha quedado reflejada por diversos estudios efectuados en León (Cordero y Fernández, 1962), Asturias (Prieto y col., 1997), Galicia (Morrondo y col., 1999; Panadero y col., 2007), Andalucía (Martínez-Moreno y col., 1992) y Extremadura (Reina y col., 1994), de modo que, a pesar de disponer de fármacos eficaces, la incidencia de esta parasitosis sigue siendo notable en amplias zonas de nuestro país y de otros europeos, africanos y americanos. La trascendencia económica de esta miasis ha sido ignorada durante mucho tiempo, y aunque los síntomas son poco evidentes, su presencia es responsable de pérdidas muy considerables, basadas en la reducción de producción de leche, en menor ganancia de peso, muy acentuada en animales intensamente parasitados, en la depreciación de las canales y deterioro de las pieles, así como las debidas al efecto favorecedor de otras infecciones. A esto hay que añadir su carácter zoonósico, citándose con cierta frecuencia casos de infestaciones humanas.

La patogenia de la hipodermosis guarda relación con la edad y el estado inmunitario de los animales. Se ha comprobado que el ganado vacuno desarrolla cierta resistencia tras repetidas exposiciones a las larvas de *Hypoderma* spp., como lo demuestra el hecho refrendado de que los animales más jóvenes presenten, por lo general, un número de nódulos larvarios significativamente superior respecto de los de más edad. Así, en animales primoinfestados, apenas existen lesiones en el tejido conjuntivo que rodea a las larvas, mientras que, en las reinfestaciones, las larvas 1 aparecen rodeadas por áreas edematosas y con abundantes infiltrados, compuestos principalmente por eosinófilos y linfocitos; sin embargo, a pesar de esta intensa reacción, las L1 vivas nunca aparecen encapsuladas, mientras que, por el contrario, las L1 muertas se encuentran en el interior de pequeños nódulos con la estructura de un granuloma. Las larvas 2 y 3 no migran y se encuentran en el interior de granulomas subcutáneos. Esta resistencia constituye un factor importante en el control de las poblaciones del parásito, comprobándose que es dependiente del número de exposiciones previas y del número de larvas que infesten al hospedador.

La respuesta humoral se ha estudiado ampliamente, habiéndose desarrollado técnicas de diagnóstico precoz, encaminadas a detectar anticuerpos y/o antígenos parasitarios (Boulard y Weintraub, 1973; Boulard y Bencharif, 1984; Panadero y col.

2001; Colwell y col. 2003). No obstante, es manifiesta la ausencia de relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia alcanzado por los animales (Pruett y Barrett, 1985; Panadero, 1996), por lo que se sospecha que la respuesta celular, que ha sido menos investigada hasta el momento, juegue también un papel muy importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis. Nelson y Weintraub (1972) denunciaron evidencias de que la respuesta celular estaba implicada en la inmunidad frente a *Hypoderma*, como lo demostraba la fuerte reacción celular producida tras la penetración de las larvas, que se apreciaba en especial en animales reinfestados. Tras esta primera aproximación, Baron y Weintraub (1986) estudiaron la respuesta linfoproliferativa en animales primo y reinfestados recurriendo a la activación con distintos mitógenos. Estos autores sugieren que la resistencia adquirida frente a la hipodermosis presenta una base celular y que en ella participan células T y B.

El papel de las citoquinas en la regulación y modulación de la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado desde la postulación del paradigma Th1/Th2. Este paradigma propone que, tras un primer contacto con un antígeno, se produce una polarización de las células T ayudantes hacia dos respuestas distintas (Th1 y Th2) que pueden distinguirse por la expresión de determinadas citoquinas (Mosmann y Coffman, 1989). Sin embargo, aunque la realidad es mucho más compleja que una simple polarización dicotómica, este paradigma todavía resulta útil para comprender la respuesta inmune adaptativa. Así el IFN-γ, y la IL-12 son consideradas citoquinas claves en la respuesta Th1 y sirven de indicadores de una predominancia de las respuestas mediadas por células, mientras que la IL-4 participa en la polarización Th2 y su secreción sugiere un predominio de las respuestas humorales. Con respecto a la IL-10 se estima que puede ser un elemento que participe en ambos tipos de respuesta inmune presentando un efecto regulador (McGuirk y Mills, 2002).

Actualmente la lucha frente a la hipodermosis bovina se centra únicamente en la administración de fármacos, cuyo uso plantea algunos problemas, tanto para los animales (toxicidad, dosificación y periodos de aplicación, etc.), como para la salud humana (presencia de residuos en leche y carne), e incluso de concentración en el medio. Por otra parte, la falta de eficacia de las vacunas probadas, basadas en distintas fracciones antigénicas del parásito, sugiere la participación de otras moléculas y de mecanismos más complejos en el desarrollo de protección por parte del hospedador. De ahí, que la búsqueda de nuevas estrategias de lucha vaya orientada a reforzar mecanismos naturales de defensa del hospedador. Actualmente hay poca información disponible sobre el tipo de respuesta inmunitaria que pueda ser

responsable directa de inmunidad protectora frente a *Hypoderma* en ganado vacuno. Por este motivo, es necesario un conocimiento más profundo de las respuestas del hospedador frente esta miasis, lo que permitirá en el futuro llegar a nuevas estrategias, basadas en tratamientos moduladores encaminados a limitar el desarrollo y la presencia de larvas.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, planteamos un estudio encaminado a conseguir los siguientes **OBJETIVOS GENERALES**:

1.- Estudiar la respuesta celular local durante la penetración de las larvas 1 en ganado vacuno infestado experimentalmente por *Hypoderma lineatum*.

2.- Establecer diferencias entre animales primoinfestados y reinfestados como base para esclarecer los mecanismos de resistencia frente a este parásito.

3.- Determinar el patrón de producción de distintas citoquinas implicadas en el inicio de las respuestas inflamatoria e inmunitaria frente a las larvas de *Hypoderma* y estudiar su actividad inmunoreguladora.

Revisión bibliográfica

2.1.- AGENTE ETIOLÓGICO

La hipodermosis es una miasis producida por moscas de la familia Oestridae, cuyas larvas ejercen un gran impacto sobre la productividad y bienestar de los animales domésticos.

De las seis especies incluidas tradicionalmente en el género *Hypoderma* (Zumpt, 1965) sólo dos parasitan de forma obligatoria al ganado vacuno, *Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758) e *Hypoderma lineatum* (de Villiers, 1789), denominadas respectivamente mosca grande y pequeña de los bóvidos. Recientemente, y tras intensos debates y discusiones dentro de la comunidad científica (Otranto y col., 2004, 2005; Otranto y Colwell, 2005), ha sido aceptada como especie válida, *Hypoderma sinense*, considerada durante mucho tiempo como sinónimo de *H. lineatum*. No obstante, la distribución de esta especie se encuentra restringida a China donde afecta a yacks y a ganado vacuno.

2.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE *H. bovis* E *H. lineatum*

Las **moscas adultas** de *Hypoderma* spp. poseen un revestimiento piloso abundante que aparece estriado en el abdomen formando tres anillos de color; la cabeza es fuerte y más ancha incluso que la parte anterior del tórax, que es esférico; los ojos están bien desarrollados y separados; sus piezas bucales son afuncionales, ya que se encuentran atrofiadas (Zumpt, 1965). El abdomen es más estrecho que el tórax; en las hembras el último segmento está modificado formando el ovipositor, que sirve para depositar los huevos sobre los pelos de los bovinos. Poseen dos alas pardo-grisáceas y tres pares de patas.

Los adultos son muy móviles y rápidos; en estado de reposo la cabeza está más alta, de modo que su postura respecto del plano horizontal es típicamente inclinada con las alas divergentes.

H. bovis mide de 12 a 16 mm de longitud; es la llamada mosca grande de los barros. Es la más parecida a un abejorro, su cuerpo está recubierto de abundante pilosidad en cabeza, tórax y abdomen (Gil-Collado, 1961). El primer segmento abdominal es gris con algunos pelos blancos o amarillentos, el segundo es más oscuro, casi negro y el tercero es amarillo oscuro; sus alas son grandes y de color gris, no transparente (Zumpt, 1965). Las patas son lisas y poco pilosas.

H. lineatum es la mosca pequeña de la hipodermosis, llamada también "mosca de la pezuña o de las cuartillas". Los machos miden hasta 12 mm y las hembras no sobrepasan los 13 mm. Las pilosidades del tórax son blanco-amarillentas y en el abdomen los pelos se disponen formando una banda amarilla clara que alterna con otra más oscura y finaliza con una anaranjada. Sus alas son transparentes y las patas tienen abundante pilosidad oscura y son rugosas.

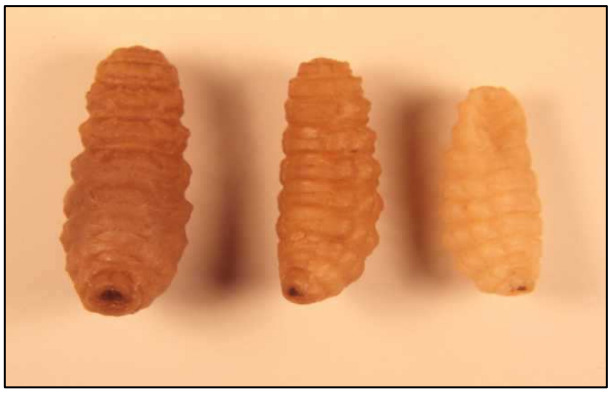
En ambas especies los **huevos** son de color blanco, sin opérculo y de forma alargada. Se fijan a la base del pelo por un pequeño pedúnculo flexible con dos ramificaciones laterales de sustancia gelatinosa con la que se adhieren firmemente en posición oblicua respecto del pelo, dificultando su separación del mismo (Cogley y col., 1981). El tamaño de los huevos de *H. bovis* es de 1 mm y en cada pelo se disponen de forma individual, mientras que los de *H. lineatum* se situan en el mismo pelo en hileras de 5 a 15 huevos y son ligeramente más pequeños.

Las larvas eclosionadas o **larvas 1** (L-1) son muy delgadas, fusiformes y con los extremos redondeados.

Son totalmente transparentes, apreciándose bien sus órganos internos; el tubo digestivo está constituido por el esófago o intestino anterior al que se unen dos glándulas salivares; se prolonga con el intestino medio repleto de líquido amorfo ligeramente verdoso que dilata y da turgencia a la larva; el intestino medio se encuentra obstruido caudalmente por una masa celular que lo separa del intestino posterior (Boulard, 1969).

Su cuerpo está dividido en 11 segmentos casi iguales, con espinas de distinto tamaño que se disponen en filas irregulares dirigidas hacia atrás, lo que les impide retroceder cuando se desplaza por los tejidos del hospedador. La L-1 recién eclosionada mide menos de 1 mm; a su llegada a los campamentos de invierno (submucosa esofágica y canal raquidiano) alcanza 5 mm, sobrepasando al final de su migración los 15 mm (Arru y col., 1985; Panadero y col., 2007). En el extremo anterior posee un "aparato bucal" o esqueleto cefálico, compuesto por un espolón medial y dos ganchos laterales cuya forma es diferente en ambas especies, lo cual permite su identificación. Los ganchos bucales de *H. lineatum* poseen un extremo anterior afilado no dividido y con un diente lateral curvado; por el contrario, los de *H. bovis* están divididos en su extremo anterior y no poseen diente lateral (Weintraub y col., 1968). En el extremo final las L-1 de *Hypoderma* spp. poseen dos placas estigmáticas que consisten en dos pares de aberturas espiraculares, cada una de ellas rodeadas por un anillo con 3 espinas (Colwell, 1989).

Las **larvas 2** son más redondeadas, más anchas en su parte central y estrechándose en los extremos anterior y posterior. Alcanzan 10-16 mm de largo y 4-5 mm de diámetro; son de color amarillo-blanquecino y están dotadas de movientos contráctiles. Presentan espinas cuticulares fuertes que se aprecian mejor en las fases más jóvenes. Su aparato bucal ha evolucionado y están desprovistas de ganchos bucales. Su aparato respiratorio está bien adaptado a la vida aerobia, con dos placas estigmáticas posteriores de forma circular que constan de varios anillos estigmáticos. Mediante microscopía electrónica, Colwell (1989) puso en evidencia la presencia de 29 a 40 aberturas en las placas respiratorias de las L-2 de *H. bovis*, mientras que las de *H. lineatum* poseen tan solo 18-25.



Las **larvas 3** son gruesas y presentan forma de tonel; miden entre 2,5 y 3 cm de largo y 1,4-1,7 cm de diámetro (Borchert, 1964); su cara ventral es convexa y la dorsal ligeramente plana o cóncava. Su cuerpo está dividido en 11 segmentos, la mayor parte de los cuales lleva en la parte anterior de la cara ventral una línea de espinas gruesas, oscuras y dirigidas hacia atrás y en la parte posterior una banda de pequeñas espinas quitinosas, dirigidas hacia delante. La parte ventral anterior del décimo segmento de las L-3 de *H. bovis* no tiene espinas, mientras que en *H. lineatum* sí se observan bien (Lapage, 1956). Las espinas están menos desarrolladas en la cara dorsal (Zumpt, 1965).

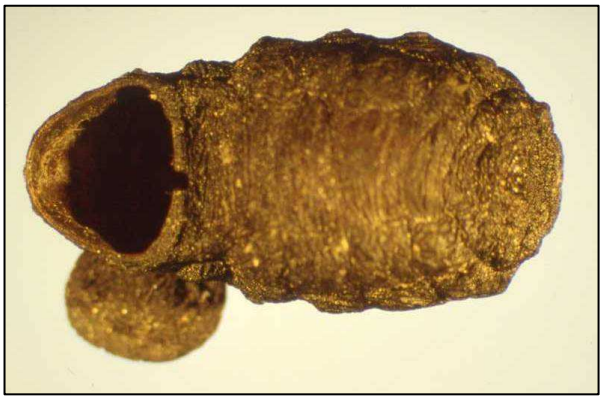
El color de las L-3 depende mucho de su momento de desarrollo; al principio es pardo amarillento, posteriormente se va oscureciendo considerablemente, hasta hacerse marrón oscuro o negruzco poco antes de abandonar el hospedador.

Con la microscopía electrónica de barrido se ha estudiado en detalle el patrón de distribución de las espinas cefálicas y torácicas, así como la forma de las placas respiratorias y de la sutura opercular, lo que ha permitido diferenciar con claridad las tres especies que afectan a los bóvidos (*H. lineatum*, *H. bovis* e *H. sinense*) y a los cérvidos

(*H. diana*, *H. actaeon* e *H. tarandi*) (Colwell y col., 1998, 2001; Otranto y col., 2003, 2004).

Las L-3 de *Hypoderma* spp., al igual que las L-2, son aerobias y respiran a través de unos estigmas u orificios respiratorios localizados en las placas respiratorias situadas en el último segmento. La forma de las placas así como la disposición de los orificios respiratorios es diferente según se trate de una u otra especie. En *H. bovis* las placas respiratorias son redondeadas y se encuentran profundamente incurvadas en su centro con un canal de separación largo y estrecho, cada una de ellas está dividida en 10 septos, los cuales poseen hasta una treintena de orificios respiratorios, rodeados por un pequeño anillo, que normalmente lleva una espina. En *H. lineatum* las placas respiratorias son más planas, el canal de separación más abierto y están divididas en 7 septos, cada uno de los cuales posee menos de 30 estigmas rodeados por un anillo que no lleva espinas (Colwell, 1989).

Scholl y col. (1989) establecieron, en base al color de la cutícula y desarrollo de los espiráculos respiratorios, tres fases en el desarrollo de las larvas 3 de *Hypoderma* spp. En la fase más temprana (P1), las larvas son aparentemente blancas y sus placas respiratorias posteriores están sin mecanizar; al final de esta fase, la cutícula ya es amarilla y, los márgenes de las placas respiratorias comienzan a melanizarse. En la segunda fase (P2) las placas estigmáticas se oscurecen progresivamente, de modo que al comienzo de la última fase (P3) la larva ya posee una cutícula oscura aunque no tanto como cuando están a punto de salir para la pupación; sin embargo, las placas respiratorias posteriores están ya completamente desarrolladas y melanizadas.



Para la recogida de las larvas 2 y 3 está totalmente desaconsejada la extracción o deslarvado manual, ya que es frecuente que al presionar los nódulos presentes en el dorso se produzca la rotura de las larvas y el consiguiente riesgo de choque anafiláctico. Bishopp y col. (1926) y Barret (1981) colocan un dispositivo (bote, bolsa, etc.) sobre los nódulos larvarios que recoge la larva una vez que ésta abandona al hospedador; Minar y Breev (1982) recogen las larvas maduras de *Hypoderma* spp. manteniendo a los bovinos parasitados sobre una rejilla metálica. Scholl y Barrett (1986) idearon un método rápido y eficaz de extracción que consiste en la inyección a través del orificio respiratorio de aproximadamente 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3%. Estas larvas así recogidas, si se extraen con un grado de madurez óptimo y se lavan inmediatamente con agua, no mueren más ni más rápidamente que las que emergen de forma natural; en todo caso, la tasa de mortalidad será similar a la de las que abandonan prematuramente al hospedador.

Las larvas 3 que caen al suelo quedan inmóviles, su cutícula se endurece considerablemente y forman las **pupas** o **puparios**. El color de las pupas es prácticamente negro, están aplanadas por su parte anterior y tienen un opérculo bien visible por el que saldrá la mosca adulta después de la pupación (Zumpt, 1965).

La pupa tiene una longitud de 2-2,8 cm por 1,4-1,8 cm de grosor, siendo algo menor la de *H. lineatum*, y en ella se ven las protuberancias, a modo de espinas, mejor que en la de *H. bovis*.

2.2.- CICLO BIOLÓGICO

2.2.1.- BIOLOGÍA

Las **moscas adultas** de *Hypoderma* spp. completan su metamorfosis en 2-5 semanas y emergen del pupario; para ello levantan el opérculo mediante la vesícula cefálica o *ptilinum*. Esta salida se produce a las pocas horas de la salida del sol, probablemente como una respuesta al incremento de la temperatura. Los adultos tienen las piezas bucales atrofiadas y por ello no se alimentan durante la fase de vuelo (Zumpt, 1965). Su vida es muy corta y depende de las reservas acumuladas a lo largo del desarrollo larvario, cuyo agotamiento se asocia, en gran medida a la temperatura; la mayoría de los autores (Pfadt, 1975; Boulard y col., 1988a y Benakhla y col., 1993) señalan una vida media de 3-4 días y raramente superior a 8 días.

Los oéstridos poseen en general una gran capacidad voladora, siendo capaces de alcanzar velocidades de 28,8-40 km/h (Nilssen y Anderson, 1995) y de desplazarse en un radio de 5 km y a veces hasta 14 km; no penetran en los establos ni en locales cerrados y siempre “atacan” a los rebaños en los pastos y en espacios abiertos. En este sentido, Benakhla y col. (1993) comprobaron en Argelia que los bovinos que permanecían estabulados durante todo el año apenas se encontraban parasitados, mientras que los que pastaban al aire libre estaban más parasitados, alcanzándose cifras medias de 17,5 barros por animal.

Las hembras de *Hypoderma* realizan un vuelo corto, circular, rápido y especialmente ruidoso, siendo esto último lo que amedrenta especialmente al ganado vacuno, provocando a veces auténticas estampidas.

La cópula se realiza al poco de abandonar la mosca el pupario y tiene lugar generalmente en el suelo, aunque en algunas ocasiones se ha observado en pleno vuelo (Weintraub, 1961).

Según Scholl y Weintraub (1988), las hembras de *Hypoderma* poseen dos adaptaciones muy particulares para compensar su corto periodo de vida. Una de ellas es que el comienzo de la oogénesis ya tiene lugar en las L-3 y en las pupas, y otra es el desarrollo simultáneo de dos oocitos en el mismo ovario, lo cual duplica su capacidad

reproductora, de modo que a partir de una sola pareja de moscas se puede infestar, en tan solo dos años, a todos los individuos de un rebaño de 100 bovinos.

Una vez fecundada, cada hembra puede depositar entre 500 y 1000 huevos, llegando incluso a disponer hasta 100 huevos sobre un mismo animal. El **comportamiento de la puesta** de los oéstridos se caracteriza porque cada mosca tiende a depositar sus huevos en el mayor número de hospedadores posible con el fin de disminuir la competición entre su propia progenie y aumentar las posibilidades de que parte de su descendencia complete el ciclo. Las hembra de *H. bovis* deposita los huevos durante el vuelo, causando un gran desconcierto por el sonido que emite, similar al de una abeja; la puesta se produce en los miembros posteriores del bovino y en lugares fácilmente accesibles para la mosca. Depositan un huevo de cada vez, con lo cual han de multiplicar el número de visitas al hospedador. Por el contrario, *H. lineatum* apenas molesta al hospedador durante la oviposición, depositando cada vez los huevos en hileras de 6-15 en los pelos de los miembros anteriores, papada y nacimiento del cuello. En ocasiones la mosca desde el suelo se acerca a los animales que se encuentran tumbados para depositar los huevos. De acuerdo con Colwell y Berry (1993), las hembras de *H. bovis* poseen un mayor número de receptores químicos y mecánicos que las de *H. lineatum*, ya que debido a su forma de puesta necesitan mayor sensibilidad a la hora de localizar al hospedador.

La aparición en la naturaleza de formas intermedias entre *H. bovis* e *H. lineatum* ha llevado a algunos autores a estudiar la posibilidad de hibridación entre ambas especies. Weintraub (1961), tras varios intentos llevados a cabo sin éxito en el laboratorio, llegó a la conclusión de que la hibridación no era posible. Más tarde, Weintraub y col. (1968) demostraron que las formas intermedias no eran el resultado del cruzamiento de las dos especies de *Hypoderma*, ya que sólo se manifestaban en los estadios de L-1 y L-2, tanto procedentes de infestaciones naturales como experimentales. A pesar de la ausencia de una barrera morfológica que impida la fecundación cruzada de ambas especies, ésta no ocurre. Además, ninguno de los huevos depositados por hembras a las que se les había transferido esperma de la otra especie mostró desarrollo embrionario.

En el interior del huevo el embrión es inmóvil hasta que eclosiona a los 3-4 días de la puesta; la salida se produce a través de una fisura que se abre en la cubierta del huevo por acción directa de la larva. En cuanto al desarrollo embrionario, Pruett y Kunz (1996) comprobaron que los huevos de *H. lineatum* no toleran una exposición prolongada

a bajas temperaturas, siendo el límite inferior para el desarrollo embrionario de 20ºC. Por otra parte, estos autores afirman que las condiciones en la piel del ganado vacuno resultan propicias para el desarrollo embrionario puesto que la temperatura no desciende de 25ºC.

Las L-1 recién eclosionadas descienden por el pelo con movimientos ondulatorios vermiformes, guiadas por estímulos térmicos. Karter y col. (1992) demostraron que las larvas recién eclosionadas presentaban termotaxia positiva pero no fototaxia ni geotaxia. Posteriormente, las larvas penetran activamente en el tejido subcutáneo, aprovechando frecuentemente la depresión que rodea a los folículos pilosos; a esto contribuye el esqueleto cefálico, las enzimas proteolíticas y las espinas quitinosas que recubren su cuerpo. Nelson y Weintraub (1972) comprobaron que las larvas que a los 15 minutos de la eclosión todavía no habían penetrado en la epidermis, perdían su vigor, se deshidrataban y morían.

Las L-1 son endoparásitos obligados que se desarrollan en anaerobiosis, puesto que emigran profundamente a través del tejido conectivo del hospedador. Chamberlain (1964) comprobó que las L-1 pueden vivir durante largos periodos de tiempo sin oxígeno o con niveles muy bajos, lo que no implica que no puedan usarlo. La **migración** de las larvas 1 por los tejidos del hospedador se produce gracias a las enzimas presentes en sus secreciones salivales (Boulard y col., 1988a). Estas enzimas, después de haber destruido los tejidos, se acumulan en el intestino medio de las larvas.

La migración intraorgánica de las larvas es distinta según la especie; *H. lineatum* se desplaza por el tejido conjuntivo laxo intermuscular de la parte anterior del pecho y del abdomen, siguiendo líneas paralelas a los vasos sanguíneos, aunque no entra en ellos ni en los músculos, hasta la submucosa esofágica, preferentemente en su tercio caudal que es su lugar de estacionamiento o “reposo invernal”. También es frecuente encontrarlas en otros lugares distintos de la submucosa esofágica; Khan (1971) y Panadero y col. (1998, 2007) señalan su presencia bajo la serosa que recubre externamente al esófago. Otros autores (Hadwen y Fulton, 1924 y Wolfe, 1959, cit. Panciera y col., 1993) han observado larvas 1 de *H. lineatum* en tejido conectivo peritraqueal y periesofágico, pleura parietal y peritoneal, pericardio, peritoneo visceral del hígado, bazo, rumen e intestino, diafragma, músculos intercostales y tejido conjuntivo perirrenal.

Durante esta fase de reposo, las larvas aumentan hasta seis veces su tamaño, llegando a alcanzar los 12 mm de longitud. Cox y col. (1970), Panadero y col. (2007) y Quintero-Martínez y col. (2007) comprobaron que, tanto las larvas situadas en la

submucosa esofágica como las observadas en la superficie externa del esófago y tráquea se encontraban orientadas longitudinalmente a estos órganos.

Las larvas de *H. bovis* realizan una emigración calificada por Ruíz (1982) como "órgano-neurotropa", en la que emigran lentamente siguiendo los ejes conjuntivo-nerviosos, desplazándose paralelas a los nervios isquiático y radial hasta alcanzar los plexos sacro, lumbar y braquial, tardando en recorrer este trayecto unos 4 meses. El lugar de reposo de *H. bovis* es la grasa epidural del canal raquidiano, especialmente de la región torácica y lumbar, entre la 8ª vértebra torácica y la 6ª lumbar. Estas larvas entran y salen del canal medular a través de los orificios intervertebrales (Beesley, 1962).

Después de un periodo de reposo en el raquis o en el esófago, las L-1 de *Hypoderma* reinician su migración hacia los lugares de maduración bajo la piel del dorso.

Gingrich (1970) comprobó que las larvas de primer estadio son parásitos obligados que solo completan su desarrollo en los bovinos, de modo que, cuando son implantadas subcutáneamente en animales de experimentación como el ratón blanco de laboratorio, migran generalmente hacia las cavidades torácica y abdominal, donde son encapsuladas por tejido conjuntivo y mueren sin lograr salir al exterior.

Una vez en el **dorso de los bovinos** comienzan a mudar a larvas 2; para ello invierten su posición y liberan todo el contenido enzimático a través del intestino posterior, lo que provoca un orificio en la piel del hospedador de 1-3 mm de diámetro, a través del cual se ponen en contacto con el exterior e inician una vida aeróbica; posteriormente se produce la muda a L-3.

La primera muda larvaria estimula la formación de una reacción granulomatosa por parte del hospedador, rodeando a la larva, y formando un nódulo larvario, también denominado "bubón" o "barro". Las larvas 2 y 3 se nutren de restos tisulares y del contenido purulento del granuloma, creciendo muy rápidamente ya que en tres meses han de acumular las reservas necesarias para la pupación (1 mes) y vida adulta, periodos durante los cuales el insecto ya no se alimenta. Boulard (1968) y Boulard y col. (1988a) observaron que su tubo digestivo está abierto en los dos extremos, y posee una dotación enzimática rica en proteasas. Mediante pruebas radioactivas, Kasting y Mcginnis (1966) establecieron algunos de los requerimientos nutricionales de las L-3 de *H. bovis*; comprobando que la metionina, fenilalanina, tirosina, leucina, histidina, lisina, isoleucina, valina y treonina son esenciales para su nutrición.

En cuanto a la **distribución de los nódulos larvarios** en el dorso de los bovinos, la mayor parte se localiza en un área de 25 cm a ambos lados de la línea media dorsal, desde la cruz hasta el comienzo de la cola (Kettle 1990). En vacas infestadas por *H. bovis*, Hiepe y col. (1969) detectaron un elevado porcentaje de nódulos en la región lumbar (78,94%), y en menor proporción en la región dorsal (20,19%) y en la grupa (0,87%), no encontrando ningún nódulo por delante de la escápula. Por el contrario, en un estudio realizado por los servicios veterinarios del Ministerio de Agricultura francés (Anónimo, 1983) en una región en la que predominaba *H. bovis*, la mayoría de los nódulos se hallaron en la región dorsal (47,4%) y lumbar (42,6%), mientras que en la cruz, grupa y cuello solo se encontraron el 5,5, 4,4 y 0,1%, respectivamente.

Borchert (1964) señala que el tiempo medio de permanencia de las larvas en los nódulos varía con las especies; para *H. bovis* se prolonga 11 semanas (variando entre 8,5-14 semanas), mientras que para *H. lineatum* es de 7,5 semanas (oscilando entre 6-9 semanas).

Una vez que las larvas han completado su desarrollo abandonan los nódulos a través del orificio por el que respiran, ayudadas por los movimientos y las contracciones musculares del hospedador y de la propia larva, caen y penetran en suelo o se ocultan entre la vegetación, donde se preparan para pupar. Aunque las larvas de ambas especies son lucífugas, las de *H. lineatum* se entierran más profundamente que las de *H. bovis.* Tras el endurecimiento de la cutícula se produce una compleja metamorfosis que, dependiendo de las condiciones climáticas, en aproximadamente 2 a 5 semanas, dará lugar a una mosca adulta.

2.2.2.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE *Hypoderma* spp.

A lo largo del ciclo de *Hypoderma*, la mortalidad varía en función de la fase de desarrollo, así Breev (1971) estima la mortalidad en la fase de huevo en un 5-10%, la de las L-1 en un 70% y del 20-30% para las larvas 2 y 3. Minar y Breev (1982) calculan que, durante el paso de larva 3 a pupa, la mortalidad es del 6,85%, mientras que durante la fase de pupa, puede oscilar, variando según la humedad presente entre un 45-93%.

Son varios los factores que influyen en el desarrollo del ciclo de Hypoderma, interviniendo por una parte en la cronología de los periodos peligrosos para la salud animal y por otra, en la intensidad de parasitación.

2.2.2.1.- FACTORES EXTRÍNSECOS O MEDIOAMBIENTALES

La biología de *Hypoderma* spp., al igual que sucede con el resto de los insectos, está muy condicionada por los factores extrínsecos o medioambientales. El clima influye directamente sobre la evolución de los estadios libres del parásito, interviniendo tanto en la cronobiología del parásito como en la intensidad de parasitación. De este modo, la programación de campañas de lucha y erradicación de la hipodermosis en una determinada región debe apoyarse en el conocimiento previo de los períodos aproximados en los que tienen lugar las distintas fases del ciclo y las adaptaciones resultantes de las condiciones climáticas registradas cada año; esto adquiere especial importancia en el caso del tratamiento preventivo, ya que ha de administrarse al ganado una vez que la actividad de las moscas adultas haya cesado, pero antes de que las L-1 alcancen los lugares de estancia invernal.

Con respecto a la **cronobiología**, diversos autores (Tarry, 1980; Boulard y col., 1988a; Martínez-Gómez y col., 1988; Prieto y col., 1990; Lonneux y col., 1991 y Panadero y col., 1993, 1994a, 2000) han señalado que, las temperaturas altas, días soleados y ausencia de viento, favorecen el desarrollo del ciclo, mientras que días nublados o tormentosos y vientos fuertes lo dificultan o retrasan.

La distribución de las 2 especies de *Hypoderma* diferirá según el área geográfica, aunque en una misma zona pueden coexistir los dos ciclos, que normalmente no se

superponen completamente en el tiempo. En conjunto, el ciclo dura de 8-11 meses y, en condiciones normales, sólo hay una generación de moscas al año. En climas templados el ciclo de *H. line*atum se adelanta uno o dos meses respecto al de *H. bovis* (Pfadt, 1947; Tarry, 1981; Boulard y col., 1988a y Berkenkamp y Drummond, 1990) y estas diferencias pueden ser mayores en zonas con condiciones climáticas extremas, como sucede al este de las Montañas Rocosas en América del Norte (Scharff, 1950), o en regiones áridas de Irak (Abul-Hak, 1973). En España, Talegón (1969), Martínez-Gómez y col. (1988) y Panadero (1996) realizaron un seguimiento del ciclo biológico de las 2 especies de *Hypoderma* y observaron que el vuelo y el periodo de puesta de *H. lineatum* se adelantaba al menos 1-2 meses con respecto a *H. bovis*.

En el sur de España la cronobiología de *Hypoderma* se aproxima a la señalada para los países norteafricanos. Así, Martínez-Gómez y col. (1988) comprobaron que las moscas estaban activas desde febrero a finales de mayo; observando las L-1 en el esófago y raquis desde principios de abril hasta mediados de enero y los barros en tejido subcutáneo del dorso entre mediados de noviembre y finales de mayo. Reina y col. (1994) comprobaron que, desde octubre a abril, era posible detectar L-3 en el dorso del ganado. La aparición de moscas se concentraba entre los primeros días de marzo y comienzos de mayo, mientras que las L-1 de *H. lineatum* podían observarse en los esófagos desde septiembre a diciembre. Asimismo, Hurtado (1999), en la alta Extremadura, comprobó que las larvas 3 estaban presentes desde octubre hasta mayo, mientras que el período en que pueden ser observadas las L-1 de *H. lineatum* en el esófago va de septiembre a diciembre, ambos inclusive.

En la provincia de León, Cordero (1962) observó que los adultos de *H. bovis* y la puesta de los huevos se efectuaba entre finales de junio y mediados de septiembre, mientras que la emigración larvaria a lo largo de los nervios hacia la zona subcutánea del dorso, tenía lugar entre julio y febrero.

En la mayor parte de Galicia, la cronobiología de la hipodermosis según Díez y col. (1995) y Panadero (1996) se ajusta al siguiente modelo: desde mediados de mayo a septiembre tiene lugar el vuelo de las moscas, la puesta de los huevos y el inicio de la migración larvaria. Entre agosto y finales de diciembre, las larvas 1 se encuentran en los lugares de estancia invernal. Desde octubre hasta enero, se completa la migración larvaria hacia el dorso y entre diciembre y junio se detectan la mayoría de los nódulos larvarios subcutáneos. No obstante, como ya señalamos anteriormente, esta cronología varía de un año a otro en función de la climatología; así, Panadero (1996) observó que en

los años en que las condiciones climáticas eran favorables para el ciclo de *Hypoderma*, éste se adelantaba 1 o 2 meses respecto a aquellos en los que la meteorología era más adversa. En diversos estudios realizados en Galicia, se ha visto tanto por inmunodiagnóstico como por diagnóstico directo que los porcentajes de parasitación en las zonas costeras son menos elevados que en el interior (Panadero y col., 1994a, 2000, 2007).

Los adultos de *Hypoderma* spp. son especialmente vulnerables a las condiciones adversas, de modo que la **intensidad de parasitación** está influida en gran medida por las condiciones climáticas. Las moscas están activas en los días soleados, con temperaturas próximas a 18ºC. La luz del sol interviene en el éxito de la puesta, de modo que en años con veranos fríos y húmedos, la infección de los bovinos en la primavera siguiente es menor, debido a una oviposición incompleta por parte de las moscas adultas. El contacto con el hospedador y la eficacia de la puesta son mayores cuando las temperaturas son óptimas (Beesley, 1966 y Tarry, 1980).

Tarry (1980) encontró una correlación positiva entre la incidencia de la hipodermosis y distintos factores climáticos, sobre todo la temperatura media del aire en los meses de verano (junio-agosto) y también respecto a las horas de sol; la lluvia está correlacionada negativamente con la incidencia de la hipodermosis, aunque esta correlación no fue estadísticamente significativa. Según Walton (1928 cit. Tarry, 1980) la lluvia excesiva puede destruir a larvas, pupas y adultos.

En este sentido, Weintraub y col. (1961) estudiaron la influencia de las elevadas temperaturas registradas en Texas sobre la reproducción de los adultos y la supervivencia de las pupas de *Hypoderma* spp., señalando que, a pesar de que los días lluviosos y nublados pueden impedir el apareamiento de las moscas, el factor medioambiental que actua como limitante son las elevadas temperaturas registradas por la tarde, lo que hace que la puesta se produzca sobre todo por la mañana y a primeras horas de la tarde.

Yamov y col. (1990) consideran que la temperatura ambiental y la iluminación son los factores principales que determinan la actividad de *Hypoderma diana*, especie que parasita al ciervo.

Karter y col. (1992) trataron de inducir con luz artificial la oviposición de *Hypoderma tarandi*, cuyos hábitos de puesta son similares a los de *H. bovis*, pero sus intentos fueron infructuosos, de lo que dedujeron que las hembras de *Hypoderma*

únicamente depositan los huevos bajo la luz natural del sol. Asimismo, comprobaron en condiciones de laboratorio que los huevos de *H. tarandi* únicamente evolucionaban a temperaturas comprendidas entre 20 y 37ºC y que su desarrollo era más rápido cuando se incubaban con el 77% de humedad relativa que cuando se hacía con el 100%. Estas condiciones óptimas halladas en condiciones experimentales, coinciden con las del propio hábitat natural del hospedador donde *H. tarandi* fija sus huevos, cerca de la piel y de la base del pelo.

De acuerdo con Pfadt (1975), la formación de las pupas tiene lugar bajo un amplio intervalo de temperaturas, 14-26ºC para *H. lineatum* y 14-25ºC para *H. bovis*, lo que indica que las pupas de *H. bovis* son menos tolerantes a las altas temperaturas, pudiendo condicionar esta diferencia la distribución de las dos especies. El periodo de pupación de *H. lineatum* oscila entre 11 días a 26ºC y 35 días a 16ºC, mientras que para *H. bovis* lo hace entre 14 días a 28ºC y 47 días a 16ºC.

Kettle (1990), basándose en resultados obtenidos por otros autores, señala que en zonas de clima templado, como sucede en el sur de Inglaterra, la salida de las larvas o prepupas del animal acontece a primeras horas de la mañana, mientras que en zonas con clima más frío, como en Canadá, la salida se produce alrededor del mediodía. Una vez en el suelo, las prepupas pueden sobrevivir bajo la nieve, y tras el endurecimiento de la cutícula incluso pueden sobrevivir a -28ºC. A 20ºC el desarrollo de *H. lineatum* es independiente de la humedad, mientras que para *H. bovis* el nivel óptimo de humedad es del 76%.

En la antigua URSS, Solopov (1988) encontró que una vez que las larvas 3 de *H. tarandi* han madurado en el hospedador, su desprendimiento dependerá de que las temperaturas sean superiores a 0ºC, observando que se producía con temperaturas de más de 6ºC e iluminaciones mayores de $18x10^3$ lux. De este modo, el 70-82% de las larvas abandonan el hospedador en las horas más calientes y brillantes del día (entre las 9.00 y las 15.00 horas). Cuando las larvas caen sobre un suelo en el que no existe hielo y hay una buena cubierta de hierba o musgo, el 99% consiguen pupar y el porcentaje de moscas que eclosionan es del 75,1%. En suelos helados o cubiertos de nieve, el 77,4% de las larvas puparon aunque la mortalidad fue progresiva y sufrieron un retraso de 15-24 días mientras había heladas. Si las larvas caen sobe roca limpia, con temperaturas positivas y alta iluminación, la mayor parte de las larvas (81,6%) se morían a las tres horas, llegando a adultos tan sólo el 3,7-5%.

Minar y Breev (1982) en la antigua Checoslovaquia observaron que la mayor parte de las larvas abandonan al hospedador por la mañana y que con temperaturas entre 15-20ºC la larva se transforma en pupa en 24-48 horas.

Weintraub y col. (1961) comprobaron que las elevadas temperaturas registradas en el sur de los Estados Unidos (Texas) provocan la muerte de las pupas, sobre todo de *H. lineatum*, lo que coincide con lo observado por Tarry (1980), quien comprobó que, con temperaturas altas y ambiente muy seco, la mortalidad de las larvas es elevada, debido a la superficie del suelo resulta difícil de penetrar.

Breev y col. (1980) estudiaron la influencia de temperaturas constantes o alternas sobre el desarrollo pupal de *Oestrus ovis*, obteniendo peores resultados con temperaturas constantes, debido probablemente a la falta de algún estímulo del tipo del incremento de la temperatura matinal que ocurre bajo condiciones naturales.

Chamberlain (1989) encontró que aproximadamente un 18,5% de las larvas 2 y 3 de *H. lineatum* conseguían pupar en un medio artificial suplementado con penicilina, estreptomicina y nistatina, aunque tan solo un 3,7% lograba eclosionar; mientras que, en *H. bovis* sólo puparon el 5%, aunque obtuvo mayor porcentaje de L-2 que mudaron a L-3 (32,5% vs. 8%).

La salida de las moscas de los puparios tiene lugar en un rango más estrecho de temperatura que para la pupación. Las moscas de *H. lineatum* no emergen a temperaturas inferiores a 14ºC ni superiores a 28-31ºC, siendo la óptima a 20ºC. Pfadt y col. (1975) observaron que a temperaturas constantes de 20ºC se obtenía un 72% de adultos, mientras que cuando las temperaturas alternaban entre 15 y 25ºC conseguía el 86% de adultos.

Scholl (1990) en una revisión sobre los enemigos naturales de las L-3 libres de *Hypoderma* spp., señala diversos géneros de bacterias, insectos, moluscos, pájaros y roedores. Solopov (1988) observó que cuando las larvas caen en superficies húmedas de madera se produce una mortalidad superior al 47,4% debido a infecciones fúngicas; comprobando asimismo que las hormigas rojas (*Formica rufa*) actuaban también de fuerte depredación. Posteriormente, Okunev (1990) señala que las larvas activas de *Fannia* spp. son grandes depredadores de las pupas de *H. bovis*.

2.2.2.2.- FACTORES INTRÍNSECOS O DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR

En la incidencia de la hipodermosis también tienen mucha importancia los factores intrínsecos o dependientes del hospedador, entre los que destacan la especie, edad, raza y sexo. Respecto a la **especie**, los bovinos son hospedadores específicos, aunque ocasionalmente caballos, ovejas, rumiantes silvestres, etc. y el mismo hombre, también pueden resultar afectados.

En relación con la **edad**, numerosos autores (Gingrich, 1980; Pruett y Barrett, 1984; Chauvin, 1987; Baron y Colwell, 1991b; Benakhla y col., 1993 y Panadero y col., 1994a, 2000) afirman que los animales de mayor edad presentan prevalencias e intensidades de infestación más bajas, probablemente debido al desarrollo de una cierta protección como consecuencia de contactos previos con las larvas del parásito.

Por otra parte, Weintraub y col. (1961) y Gingrich (1980) señalan que los bovinos más jóvenes tienen una resistencia innata que parece actuar por medio de mecanismos y que disminuye con la edad, lo que se traduce en una elevada mortalidad de las larvas (65-75%) durante su trayecto migratorio y especialmente cuando atraviesan la piel del hospedador. No obstante, con respecto a la edad hay que decir que más que la edad lo que realmente influye es su estado inmunitario, determinado por el número de contactos previos que el animal haya tenido con el parásito. En este sentido, Benakhla y col. (1993) y Panadero y col. (1994b) encontraron mayor intensidad de parasitación en los bovinos que habían pastado más de una temporada que en los que lo hacían por primera vez.

La influencia de la **raza** no está suficientemente aclarada, sin embargo en Francia, Chauvin (1987) comprobó que los bovinos charoleses eran más sensibles a la infestación por *Hypoderma* que los de otras razas. Asimismo, Navarrete y col. (1993) y Panadero y col. (1994a), en diferentes zonas de España, señalaron que la seroprevalencia de hipodermosis es mayor en vacas frisonas que en las procedentes de cruces. Igualmente, Benakhala y col. (1993) en Argelia, comprobaron que las frisonas tenían en general mayor número de barros que las "Montbelliardes" y lo relacionaron con el grosor de la piel. Asímismo, Charbon y Pfister (1992) encontraron una relación entre el grosor de la piel y la tasa de parasitación.

No obstante, en trabajos posteriores Panadero y col. (2000) encontraron seroprevalencias más elevadas en razas como la Rubia Gallega, criada

tradicionalmente en un régimen extensivo o semiextensivo, lo cual aumenta las posibilidades de entrar en contacto con el parásito. Este hecho, señala al sistema de manejo como un factor importante que afecta al desarrollo de la enfermedad.

Con respecto al **sexo** de los hospedadores, Folstad y col. (1989), en renos parasitados por *H. tarandi,* observaron que las hembras y los machos castrados presentaban niveles de parasitación más bajos, debido probablemente a que los machos tienen menor capacidad para desarrollar una respuesta inmune debido a las elevadas concentraciones de corticosteroides presentes en el plasma que proceden de los altos niveles de testosterona.

2.3.- PATOGENIA

La infestación por larvas de *Hypoderma* provoca importantes efectos nocivos en los tejidos del hospedador debidos sobre todo a la acción mecánica ejercida por sus apéndices cefálicos y también la acción proteolítica e inmunitaria de sus secreciones salivales (Lecroisey y col., 1983). Esta acción patógena está condicionada en gran medida por la intensidad de parasitación y por la resistencia de los hospedadores lo que, a su vez, está condicionado por factores como contactos anteriores con las larvas parásitas y el estado sanitario general.

Las larvas eclosionadas del huevo atraviesan activamente el tegumento del animal, aprovechando una depresión que rodea a los folículos pilosos; si transcurridos varios minutos no han encontrado un lugar apropiado para la penetración, se resecan y dejan de moverse, muriendo sin lograr su objetivo. El líquido incoloro que rodea a las larvas recién eclosionadas, además de impedir su pronta desecación, también contribuye en opinión de Nelson y Weintraub (1972), a la lisis enzimática de los tejidos, en la que también toman parte activa los apéndices cefálicos o cefaloesqueleto de las L-1 y las espinas quitinosas que recubren su cuerpo.

Las L-1 de *Hypoderma* spp., utilizan las enzimas segregadas por sus glándulas salivales para lisar y digerir el tejido conjuntivo e inhibir la formación de fibrina, limitando la posibilidad de enquistamiento. Boulard (1969) indicó que la digestión discurre fuera de la larva, y posteriormente ésta reabsorbe parcialmente sus enzimas junto con los productos de degradación del tejido del hospedador y los almacena en el intestino medio, que está cerrado en su extremo final por un tapón celular. Estas enzimas metabólicas son sintetizadas durante toda la fase migratoria, es decir, desde que emergen de los huevos hasta que mudan a L-2 en el dorso del hospedador. La digestión realizada por las enzimas cumple al menos dos fines: la nutrición de la larva, mediante la predigestión de los tejidos próximos, y la protección del parásito frente a reacciones inflamatorias del hospedador.

Una vez atravesada la piel, las larvas inician la emigración por el tejido conjuntivo hasta llegar a la submucosa esófagica en el caso de *H. lineatum* y la grasa epidural en el canal medular en *H.bovis*. En este proceso de emigración que se prolonga varios meses, las larvas se desplazan y aumentan su tamaño, dejando tras de si trayectos gelatinosos y hemorrágicos con un abundante infiltrado leucocitario.

En los lugares de reposo, la reacción del hospedador difiere dependiendo de que se trate de una primoinfestación o reinfestación. Según indica Boulard (1985), con las infestaciones sucesivas la reacción perilarvaria en la mucosa esofágica se intensifica de modo considerable. Tras su permanencia en estas localizaciones, las larvas 1 emprenden de nuevo la migración hasta alcanzar la posición subcutánea en el dorso del hospedador y allí mudar a larva 2 y 3.

Después de la primera muda larvaria en el dorso, se establece una comunicación entre el intestino medio y el intestino posterior que permite la expulsión del contenido acumulado durante la fase de primer estadio larvario; la liberación de estas enzimas en el tejido subcutáneo del hospedador provoca la lisis de la dermis y la epidermis, lo cual facilita la comunicación de las larvas con el medio externo.

Según Berkenkamp y Drummond (1990), la muda de las L-1 en el dorso propicia una reacción granulomatosa que tiende a encapsular al 2º y 3er estadio larvario con un tejido conectivo fibroso denso. Una vez que la larva se enquista, queda englobada en un nódulo granulomatoso de varios centímetros de diámetro soslayando al sistema inmune del hospedador. Beesley, (1966) afirma que en su interior las larvas están en un ambiente relativamente aislado y estable, evitando infecciones secundarias mediante sustancias bacterióstaticas. De acuerdo con Boulard (1979) no parece existir ninguna comunidad antigénica entre las larvas 1 y las de segundo y tercer estadio.

Finalmente, la perforación de la piel del dorso puede ser una vía de entrada de gérmenes patógenos, que tras la salida de la larva 3 originan abscesos que afectan incluso a los músculos próximos. La salida de las larvas 3 da paso al tejido cicatricial, que lleva consigo una depreciación al curtir las pieles.

En los últimos años, numerosos investigadores han centrado su trabajo en el estudio del **poder patógeno, antigénico e inmunitario de las secreciones larvarias**. Su obtención resulta fácil a partir de un homogeneizado de L-1 denominado extracto total o somático, a pesar de que, en opinión de Pruett y Barrett (1984), las proteínas solubles obtenidas de esta forma corresponden sobre todo a secreciones enzimáticas contenidas en el intestino larvario y no a antígenos procedentes del tegumento o tejidos larvarios.

Martínez-Moreno (1992) obtuvieron un antígeno de excreción-secreción incubando las larvas durante varias horas en un medio de cultivo RPMI-1640.

La purificación por cromatografía de intercambio iónico del extracto total larvario ha puesto de manifiesto la existencia de tres proteínas principales, denominadas hipoderminas A, B y C o colagenasa; estas enzimas, segregadas por las larvas durante su migración, pertenecen al grupo de las serin proteasas, que son enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia de las tripsinas (Boulard, 1970 y Tong y col., 1981).

La hipodermina C fue identificada por Boulard (1970) y posteriormente caracterizada por Boulard y Garrone (1978) y Lecroisey y col. (1979), obteniendo un peso molecular de 24 KDa. Desde un primer momento llamó la atención su fuerte actividad colagenolítica, que favorece la perforación de la piel y la migración de las L-1 a través del tejido conjuntivo profundo del hospedador. Según Lecroisey y col. (1979, 1983) y Lecroisey y Keil (1985) actúa destruyendo la triple hélice del colágeno y también se le atribuyen cierta actividad caseinolítica aunque carece de actividad antiinflamatoria.

La hipodermina A fue descubierta más tarde por Tong y col. (1981), quienes la caracterizaron como una serin proteasa con un peso molecular de 27 KDa. El análisis de su secuencia de aminoácidos sugiere una estructura homóloga a la de la colagenasa y, similar a la de otros miembros de la familia de las tripsinas.

La hipodermina B fue descubierta por Lecroisey y col. (1983), quienes, tras realizar una caracterización química y enzimática, la definieron como una serin proteasa con un peso molecular de 23 KDa.

Las hipoderminas A y B son similares a la colagenasa o hipodermina C por su secuencia de aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas; sin embargo, no poseen propiedades antigénicas, ni actividad fisiológica común con esta última; por el contrario, actúan muy activamente sobre la inhibición de la inflamación durante la migración de las larvas, induciendo una inmunosupresión en el caso de primoinfestaciones, comprobándose que esta actividad se atenúa en las sucesivas reinfestaciones (Boulard y col., 1988b).

Schwinghammer y col. (1988), al purificar mediante cromatografía de intercambio iónico las distintas fracciones que componen el extracto total larvario de *H. lineatum*, hallaron cuatro picos que se correspondían con las hipoderminas A, B y C; además obtuvieron una fracción correspondiente al segundo pico de la separación (P2), cuya naturaleza todavía se desconoce. Al comparar las propiedades bioquímicas e inmunoquímicas de esta fracción con las de las hipoderminas verificaron que su actividad proteasa estaba más relacionada con la de la hipodermina B que con la de la A. Por otra parte, la existencia de reacciones inmunoquímicas cruzadas con la hipodermina B sugiere la existencia de semejanzas entre la hipodermina B y la denominada fracción P2. Del mismo modo, Moiré y col. (1994), al realizar la secuenciación de las principales proteínas larvarias, detectaron la presencia de una proteína muy relacionada con la hipodermina B (sus secuencias de ADN coinciden en un 95%) que podría representar una variante isomórfica de esa enzima.

Pruett y col. (1988) obtuvieron para las tres fracciones pesos moleculares que difieren de los citados anteriormente, siendo 31,6 kDa para la hipodermina A, 25,1 kDa para la hipodermina B y 28,5 kDa para la hipodermina C. En cualquier caso, el peso molecular de las tres proteasas es bastante similar, lo que determina que, al hacerlas migrar electroforéticamente bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se obtengan tres bandas principales próximas entre sí, correspondiendo la banda que migra más rápidamente a la menos pesada, es decir, a la hipodermina B, seguida de la C y de la A. No obstante, a pesar de estas similitudes, estas fracciones poseen una secuencia de aminoácidos que difiere en el contenido de residuos cargados, lo que hace que estas tres enzimas posean una movilidad electroforética bastante diferente en condiciones no desnaturalizantes (PAGE). Pruett y Barrett (1984), mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones no desnaturalizantes, obtuvieron 14 bandas simples, siendo la hipodermina C la que emigraba más rápidamente, seguida de la B y de la A. Esta diferencia de carga facilita su separación mediante cromatografía de intercambio iónico, siendo actualmente el método de elección para la purificación inicial del extracto larvario de *H. lineatum* (Tong y col., 1981; Lecroisey y col., 1983; Pruett y Barrett, 1984; Pruett y col., 1988 y Panadero, 1996, Morrondo, 1998; Morrondo y col., 1999).

Pruett y Barrett (1984) fraccionaron las proteínas presentes en un extracto crudo de *H. lineatum* mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando DEAE-A50 como intercambiador aniónico y eluyendo con tampón Tris-HCl 0,001M, pH 7,5 seguido por un gradiente de NaCl de 0 a 1M, obteniendo 7 picos principales que

posteriormente fueron identificados mediante PAGE y SDS-PAGE. Del mismo modo, Morrondo (1998) al estudiar mediante electroforesis (SDS-PAGE) el extracto total obtenido a partir de larvas 1 de *H. lineatum* obtuvo tres fracciones diferentes que identificó como hipoderminas A, B y C, y de las que la HyB, cuyo peso molecular fue de 27,2 kDa, fue la que emigró más rápidamente.

En cuanto a su capacidad antigénica e inmunógena, Pruett y col. (1988), mediante "western blotting", estudiaron la cinética de anticuerpos en animales inmunizados con distintas fracciones proteicas purificadas a partir del extracto total obtenido de L-1 de *H. lineatum*; concluyeron que la hipodermina C era la más inmunógena, puesto que a los dos meses p.i. se detectaban anticuerpos contra esta fracción, mientras que con la hipodermina A se observaban un mes más tarde, por lo que consideraron a estas dos hipoderminas como los compuestos más inmunógenos del extracto larvario; no obstante, el hecho de que ambas se encuentren en grandes concentraciones al principio de la infestación, sugiere que la aparición temprana de anticuerpos podría deberse a estos antígenos. Diversos autores (Boulard, 1970; Boulard y Weintraub, 1973; Robertson, 1980; Gingrich, 1982; Pruett y Barrett, 1985; Boulard, 1985; Chauvin, 1987; Prieto y col., 1990 y Chabaudie y Boulard, 1993; Morrondo, 1998) han comprobado que la hipodermina C induce una rápida respuesta inmune, que se detecta dos meses después de la infestación; por lo tanto, desde 1970 la hipodermina C constituye el antígeno de elección para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina.

Las hipoderminas resisten bien la autodigestión, incluso en condiciones de pH óptimas (Lecroisey y col., 1983) y permanecen intactas durante los 8 meses que dura la migración larvaria intraorgánica en el hospedador. En condiciones desnaturalizantes la hipodermina B pierde antigenicidad, mientras que la A y la C, incluso en estas condiciones, conservan toda su capacidad antigénica (Pruett y col., 1988).

Las hipoderminas A y B están muy relacionadas entre sí compartiendo uno o varios epítopos; por el contrario, no comparten ningún epítopo o determinante antigénico con la hipodermina C (Lecroisey y col., 1983 y Pruett y col., 1988). Posteriormente, Moiré y col. (1994), al secuenciar las principales proteínas larvarias, observaron que las hipoderminas A y B poseen un 74% de similitud; mientras que la hipodermina C sólo presenta un 60% de similitud con la HyA y con la HyB.

La tecnología del ADN recombinante permite obtener productos proteicos de calidad antigénica comparable a los purificados a partir del parásito y en suficiente cantidad como para llevar a cabo análisis inmunológicos a gran escala. Lecroisey y col. (1987) describieron la secuencia completa de aminoácidos de la hipodermina C. Estos mismos autores junto con Tong y col. (1981) ya habían determinado las secuencias N-terminales de las hipoderminas A y B. Temeyer y Pruett (1990), llevaron a cabo el aislamiento del RNA mensajero, a partir de larvas 1 de *H. lineatum*, permitiendo de este modo la síntesis del DNA complementario para el clonado génico de las proteínas larvarias. Posteriormente, Moiré y col. (1994) efectuaron la secuenciación y clonado del ADNc que codifica a las tres hipoderminas larvarias. Más recientemente, Webster (1998) consiguió producir la hipodermina C recombinante, utilizando un fago gt11 expresado en *Escherichia coli*, si bien no fue capaz de aislarla de los extractos bacterianos. Quienes sí lo consiguieron fueron Casais y col. (1998), que expresaron el ADNc de la hipodermina C madura en *E. coli* como proteína de fusión con la glutation S-transferasa (GST) y la purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando factor X_a para romper la proteína de fusión. La proteína recombinante obtenida de esta forma mostró actividad enzimática en geles de poliacrilamida y en azocoll; además, mostró una inusual estabilidad a altas temperaturas manteniendo su actividad intacta después de dos horas de incubación a 70ºC.

En un estudio posterior, Panadero y col. (2000) compararon mediante ELISA e inmunoblotting los resultados obtenidos con la hipodermina C recombinante con los hallados mediante el empleo del antígeno natural de *Hypoderma*. La sensibilidad del ELISA con el antígeno recombinante fue del 95,8% y la especificidad del 95,7%; mientras que con el antígeno natural obtuvieron un 98,2% para ambos parámetros. Con el inmunoblotting, el comportamiento de ambos antígenos fue similar, por lo que concluyeron que el antígeno recombinante que habían obtenido, era válido para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina en condiciones de campo y que constituía una buena alternativa frente al uso de antígenos parasitarios, en especial en aquellos países en los que existe dificultad para obtener L-1 de *Hypoderma*.

Respecto a la especificidad y reacciones cruzadas entre los antígenos de *H. bovis* e *H. lineatum*, Petithory y Boulard (1979) comprobaron reacciones cruzadas importantes que pusieron en evidencia que entre ambas especies existían similitudes antigénicas; no obstante, en algunas ocasiones sólo se obtuvieron resultados positivos con el antígeno de *H. bovis*. Asimismo, Robertson (1980) confirmó la existencia de reacciones cruzadas

entre las dos especies de *Hypoderma* al detectar, mediante hemoaglutinación pasiva, títulos de anticuerpos en animales infestados experimentalmente con *H. bovis*, utilizando como antígeno extractos larvarios de *H. lineatum*. Igualmente, Khan (1981) detectó, mediante un test de reacción intradérmica, reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma*, empleando como antígeno un extracto larvario obtenido a partir de L-1 de *H. lineatum*. Posteriormente, Sinclair y Wassall (1983) obtuvieron reacciones cruzadas entre *H. bovis* e *H. lineatum*.

Las reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma* no permiten reconocer mediante ELISA de qué especie se trata; sin embargo, con la inmunoelectroforesis, que es más específica, sí se puede identificar la especie que causa la parasitación en humanos (Doby y col., 1987a).

Por otra parte destacan los efectos patógenos inducidos por las larvas de *Hypoderma* que se manifiestan inmediatamente con rapidez tras la destrucción de las larvas por medio del tratamiento otoñal, especialmente en animales muy parasitados y sobre todo cuando se realiza tardíamente (Boulard y col., 1988). Si la destrucción de las larvas se produce al principio de la migración, la respuesta antigénica es débil, porque en esta fase las larvas son muy pequeñas (1-2 mm.) y contienen una dotación enzimática relativamente pequeña. Sin embargo, conforme aumenta su tamaño, la liberación masiva de estos antígenos larvarios dará lugar a reacciones más intensas en el hospedador. De esta forma se desencadenan fenómenos de hipersensibilidad inmediata y anafilaxia descritos por Boulard y col. (1988).

La reacción alérgica puede ser de 2 tipos: hipersensibilidad tipo III, en que la liberación masiva de antígenos implica la formación de complejos inmunes con sus anticuerpos específicos, lo cual a su vez conduce a un fenómeno de Arthus, e hipersensibilidad de tipo I, que podría reforzar la liberación de mediadores que se desarrollan en la reacción de tipo III.

Además de los efectos descritos, también es posible un efecto tóxico directo causando una profunda depresión del sistema cardiorespiratorio. Según Boulard y col., (1991), este efecto tóxico puede ser también indirecto, ya que la liberación masiva de antígenos larvarios, sobre todo de las hipoderminas A y B, pueden sobrepasar la capacidad de fijación de los anticuerpos, siendo por lo tanto liberados en exceso hacia los tejidos. Beesley (1966) y más tarde Eyre y col. (1981) estudiaron los efectos de la inyección de extractos larvarios en el hospedador, descubriendo que, en animales no

sensibilizados, se produce una reacción inflamatoria tisular local, acompañada de una depresión del sistema cardiorespiratorio mientras que, en animales sensibilizados, se producía un verdadero choque anafiláctico.

2.4.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la hipodermosis se evidencian durante la fase de puesta de las moscas o en la fase subcutánea, cuando empiezan a aparecer las larvas en el dorso en forma de nódulos dolorosos a la palpación, pero son menos evidentes, en general, durante la emigración intraorgánica de las larvas. Por este motivo, se considera a esta miasis como una enfermedad zootécnica, es decir, que cursa con escasa sintomatología, que no suele preocupar al ganadero, pero que, se manifiesta por una disminución de las producciones, que será tanto más importante cuanto mayor sea la tasa de parasitación. Las pérdidas globales debidas a esta parasitosis no son fácilmente cuantificables, pero es fácil estimar que superan anualmente varios millones de euros en el conjunto del país, y que por eso esté incluida entre las principales enfermedades parasitarias.

El sonido producido por las moscas al volar, similar al zumbido de una abeja, causa temor y reflejo de huída en los animales, provocándose lesiones con cercas, paredes o alambradas, caídas, abortos, etc., al tratar de buscar refugios seguros, a veces con consecuencias muy negativas. Todavía hoy, en la época estival, se pueden ver imágenes de bovinos corriendo alocadamente con la cola levantada en la actitud conocida como “moscar”. Las carreras y desplazamientos bruscos de los animales se contagian al rebaño y dan lugar a auténticas estampidas. La excitación es más importante con *H. bovis* por el modo de puesta individual que realiza, con lo que revolotea de forma constante alrededor de los animales. *H. lineatum* causa menor excitación en el momento de su puesta porque lo hace en series de varios huevos y se acerca con menor frecuencia a los animales.

Las manifestaciones clínicas generales que coinciden con la fase prolongada de emigración son poco aparentes y se traducen en un retraso del crecimiento de los animales más jóvenes y un cierto grado de enflaquecimiento de adultos y, en particular, se resiente la producción láctea. Pueden detectarse también disfagias pasajeras ante la inflamación de la pared esofágica. Cuando las larvas que emigran por el peritoneo son numerosas, hay peritonitis y también cojeras pasajeras o paresias de distinta intensidad, dependiendo de la localización de las larvas y sus fases de desarrollo.

En el caso de infestaciones importantes, puede aparecer sintomatología más manifiesta debida en gran parte a la liberación masiva de enzimas por las larvas durante

su migración; estos síntomas son más habituales tras el empleo de un tratamiento incorrecto. En este caso, la intensidad depende del momento del desarrollo del ciclo y del número de larvas. El tipo de antiparasitario empleado modula el tiempo que tardan en aparecer los síntomas, pero éstos son semejantes con independencia del fármaco empleado. Las manifestaciones son muy similares a las de la intoxicación por insecticidas organofosforados, incluyendo fuerte salivación, esofagitis, problemas digestivos con meteorización aguda, temblores y estado apático con evolución normalmente favorable en 24-48 horas, por lo que no suele haber bajas (Boulard, 1991; Levasseur, 1991).

Eyre y col. (1981), comprobaron que la inoculación de un triturado de larvas 1 de *H. lineatum* filtrado y purificado provoca en los bovinos jóvenes alteraciones cardiorrespiratorias, pues a los tres minutos de la inoculación se observa hipotensión carotídea e hipertensión arterial, disnea y dificultades respiratorias.

La presencia de las larvas en el dorso origina forunculitis más o menos intensa en dependencia con el grado de inflamación; está acompañada de reacción dolorosa, prurito y malestar general que se observa más en los animales jóvenes, en los que suele coincidir con infestaciones importantes, sobre todo si coincide con el cambio de dentición, gestación o período de lactancia. En los adultos estas manifestaciones son menos evidentes por su mayor resistencia.

Cuando se produce la salida de las larvas, en los meses de primavera, la pequeña herida cicatriza rápidamente y sobre todo se observa la recuperación del estado general, que puede verse favorecido al coincidir con la mejora de los pastos en ese período.

Se sabe que las enzimas segregadas por las larvas durante su migración desempeñan un papel esencial para la supervivencia de las L-1 debido a una acción antiinflamatoria e inmunomoduladora. Esta acción que garantiza el éxito de la infestación, también puede favorecer el desarrollo de otros procesos. En este sentido, Araujo-Chaveron (1994) demostraron que la hipodermosis se correlaciona con un incremento de la incidencia de ciertas enfermedades y manifestaciones como metritis, mastitis, meteorismo, neumonía, tos, abortos y cojeras, así como con lesiones cutáneas y no tanto con ciertos tipos de diarreas. Asimismo, señalaron como muy probable la influencia negativa de *Hypoderma* sobre el sistema inmune de los bovinos.

2.5.- LESIONES

La infestación por *Hypoderma* spp es responsable de alteraciones locales o generales debidas a la acción patógena de las fases larvarias del parásito, especialmente por el papel inmunológico de las secreciones liberadas y por la acción mecánica e irritativa ejercida durante su migración intraorgánica.

2.5.1.- FASE DE INVASIÓN CUTÁNEA

La **reacción en el punto de entrada** es diferente dependiendo del número de infestaciones que haya sufrido el animal; en animales no infestados previamente, las larvas entran sin dificultad, ya que la reacción celular es débil, limitándose a una ligera infiltración eosinofílica. No obstante en reinfestaciones hay fuertes reacciones edematosas alrededor de la L-1, formándose un exudado seroso que aglutina los pelos alrededor de los puntos de penetración (Hawden y Fulton, 1924). En ocasiones, sobre todo en animales de piel clara, pueden observarse zonas petequiales próximas a la raíz de los pelos; microscópicamente, se observa un infiltrado de células inflamatorias, eosinófilos y restos de fibras de colágeno (Nelson y Weintraub, 1972). Simmons (1937) destaca la escasez de neutrófilos en zonas próximas a las larvas. En bovinos muy sensibilizados pueden apreciarse puntos necróticos, irritación, inflamación, costras epidérmicas y erizamiento del pelo. En estos animales la piel actúa como una verdadera barrera debido a la intensa respuesta celular que en ella se produce y que impide la entrada de nuevas larvas. En este sentido, Nelson y Weintraub (1972) comprobaron al suprimir la reacción cutánea de base celular, mediante la administración de ACTH a bovinos previamente infestados, aumentaba de forma significativa el número de larvas que lograban superar la barrera cutánea.

2.5.2.- FASE DE MIGRACIÓN Y REPOSO

Durante la **migración hacia los lugares de reposo** las larvas se desplazan y aumentan de tamaño, induciendo una reacción inflamatoria aguda que va acompañada de vasodilatación y dejan tras de sí trayectos gelatinosos con abundante infiltrado leucocitario. A ello se añade la destrucción del tejido conjuntivo que rodea a la larva por acción directa de sus secreciones salivares, ricas en colagenasa, glicoproteasa y

elastasa. Alrededor de las larvas hay una reacción edematosa, hiperémica, con infiltrado eosinofílico y abundantes fibras de colágeno irregulares y parcialmente destruidas. En el exudado que rodea a la larva se aprecian bandas de fibrina, algunos glóbulos rojos, linfocitos y eosinófilos; estas larvas vivas normalmente no aparecen encapsuladas por tejido fibroso. La alteración tisular y la reacción edematosa perilarvaria se acentúan con el crecimiento de las larvas (Boulard, 1975).

En su migración siguiendo los planos aponeuróticos de los músculos de la parte anterior del cuerpo, las L-1 de *H. lineatum* ocasionan lesiones inflamatorias locales en el tejido conjuntivo del mediastino, pleura, pulmones y diafragma, principalmente. Estas lesiones se caracterizan macroscópicamente por la presencia de focos de edema gelatinoso, amarillento o verdoso y microscópicamente se observa que el tejido edematoso está infiltrado por un trayecto denso de eosinófilos (Panciera y col., 1993).

En los **lugares de reposo** de las larvas de *Hypoderma* spp. la reacción del hospedador difiere según se trate de primoinfestación o reinfestación. En cualquier caso, en estas localizaciones no suele haber mortalidad larvaria ya que, en condiciones normales, la mayoría de las larvas que llegan al esófago o al canal raquidiano se movilizan después hacia el dorso.

En la **submucosa esofágica** las larvas de *H. lineatum* originan un edema gelatinoso con focos amarillentos acompañados con frecuencia de hemorragias petequiales alrededor de ellas. En la primoinfestación las lesiones son de escasa magnitud, ya que apenas existe edema y el color de la submucosa es blanquecino, mientras que en animales reinfestados la migración de la larva por la submucosa esofágica determina la aparición de un intenso edema gelatinoso de color amarillento, acompañado de trayectos hemorrágicos; este cuadro se confirma a nivel microscópico, donde se observa una infiltración eosinofílica y macrofágica más acentuada en las proximidades de la larva (Arru y col., 1985). Por otra parte, López y col. (1999) analizaron las lesiones en esófagos parasitados que variaron desde las apenas visibles, hasta trayectos hemorrágicos y hemorragias petequiales. A menudo las larvas estaban rodeadas de un intenso edema gelatinoso de color amarillento que, en ocasiones, afectaba prácticamente a todo el esófago. En algunos esófagos se encontraron formaciones quísticas de consistencia dura, en cuyo interior se hallaron larvas vivas o en fase de degeneración. El examen histológico reveló, en la mayor parte de los esófagos, un infiltrado inflamatorio perivascular constituido por células plasmáticas y/o macrófagos y polimorfonucleares eosinófilos. Ocasionalmente se apreció un intenso infiltrado eosinofílico alrededor de las larvas. En algunos animales

se observó también miositis, que afectaba sobre todo a la capa muscular interna del esófago, acompañada de atrofia de parcial de las fibras musculares.

Boulard (1975) describió histológicamente tres zonas distintas alrededor de las larvas esofágicas: una **zona prelarvaria**, que se corresponde con el primer estadío de una reacción inflamatoria y se manifiesta por un fenómeno vásculo-sanguíneo; no existe destrucción tisular, pero sí hay una importante vasodilatación e infiltración leucocitaria; la **zona perilarvaria,** en la que se distinguen, a su vez, tres partes: en la más externa, el tejido aparece edematoso, no existe destrucción tisular, pero las fibras de colágeno aparecen distendidas y disociadas; este tejido está invadido por eosinófilos, numerosos monocitos, neutrófilos y algunos linfocitos; el segundo nivel se caracteriza por la degradación de todas las estructuras fibrosas del tejido y, por último, el plano más cercano a la larva que se corresponde con la última etapa de degradación, se encuentra separado de la cutícula larvaria por una capa fina y amorfa constituida por las secreciones de sus glándulas salivales. Finalmente, se encuentra la **zona postlarvaria**, que presenta las mismas etapas de destrucción tisular que la anterior, pero se observa una evolución hacia la cicatrización.

Tras la aplicación tardía de un tratamiento precoz a animales infestados con *H. lineatum* aparecen en la submucosa esofágica intensos edemas gelatinosos de color amarillento, que reducen considerablemente la luz esofágica; existe también inflamación aguda con trayectos congestivos y hemorrágicos, que afectan a la mucosa y a las capas musculares del esófago. El peso del esófago se ve incrementado con la magnitud de las lesiones; no obstante, no se ha encontrado una relación entre el peso y el número de larvas presentes en él (Khan, 1971).

En el **canal raquidiano** de animales infestados por *H. bovis* en la grasa perineural macroscópicamente se observan, lesiones edematoso-hemorrágicas más o menos extensas y nódulos de varios milímetros de diámetro de color gris-amarillento, cuya consistencia varía de pastosa a dura. Histológicamente, se observan dos cuadros típicos, uno caracterizado por la presencia de trayectos necrótico-hemorrágicos ricos en fibrina, ampliamente infiltrados de eosinófilos y rodeados por un tejido de granulación intensamente vascularizado en el que predomina el componente macrofágico-eosinofílico, y otro en el que se observa un rápida evolución hacia un tejido granulomatoso, con infiltración de macrófagos, linfocitos, células epiteliales y células gigantes (Arru y col., 1985).

Sergent (1941), a pesar de no haber observado lesiones macroscópicas en la médula espinal de animales parasitados por *H. bovis*, afirma que a veces pueden aparecer hemorragias y coágulos epidurales que la comprimen, sobre todo en la región dorso-lumbar, entre la 5ª vértebra torácica y la 6ª lumbar, y que originan de problemas locomotores. Durin y Peres (1953) describen el caso curioso de un novillo en el que se encontraron tres larvas de *H. bovis* que habían seccionado parcialmente la médula a nivel de las vértebras dorsales.

Khan (1971) encontró en el canal raquidiano de bovinos infestados por *H. bovis* y tratados con organofosforados, trayectos congestivos y hemorrágicos con infiltración serosanguinolenta que afectaba al tejido adiposo del espacio epidural y a la membrana serosa que limita el canal vertebral. En algunas ocasiones aparecían pequeños coágulos en las áreas hemorrágicas, situados cerca o rodeando los orificios intervertebrales. Las larvas aparecían en la grasa epidural, o cerca de las áreas que mostraban congestión o decoloración.

2.5.3.- FASE SUBCUTÁNEA EN EL DORSO

Tras su permanencia en los lugares de reposo, las L-1 emprenden de nuevo la migración para alcanzar la posición subcutánea en el **dorso del hospedador** y allí mudar a L-2 y L-3. Después de la primera muda larvaria en el dorso, se produce la expulsión de todo el contenido acumulado durante la fase de primer estadio, el cual estimula una respuesta inflamatoria crónica no supurativa que tiende a encapsular al 2º y 3er estadio larvario mediante tejido conjuntivo fibroso (Berkenkamp y Drummond, 1990). Los fibroblastos se muestran muy activos, dando lugar a abundantes fibras de colágeno que aíslan rápidamente a las larvas (Boulard, 1975).

López y col. (1999b) analizaron los cambios anatomopatológicos del tejido subcutáneo tras la llegada de las L-1 y antes de la formación de los nódulos larvarios. Macroscópicamente, en la cara interna de la piel, se observaron quistes de diferente tamaño que en ningún caso sobrepasaban los 1,5 cm de diámetro; así como los orificios practicados en la piel por las larvas 2. Microscópicamente, en el tejido subcutáneo se evidenciaron trayectos longitudinales con restos de tejido necrosado acompañados de reacción inflamatoria con infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares eosinófilos. En una de las muestras observaron una reacción inflamatoria granulomatosa con abundantes macrófagos y células epitelioides indicativa del inicio de la formación del

nódulo larvario. También encontraron zonas de abscesificación de las áreas de necrosis de los trayectos larvarios en cuya luz había restos celulares y un abundante infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos.

Este quiste, que corrientemente se denomina “barro”, es similar a un forúnculo y rodea a la larva. En torno a ella hay un contenido sanguinolento y purulento con restos de tejidos que crece con rapidez.

Marcato (1990) describe macroscópicamente estos nódulos como duros, elevados y circunscritos, cuyo tamaño variable oscila entre 1 y 5 cm de diámetro. Histológicamente, los nódulos más recientes, aún no perforados, tienen una cavidad interna con tejido de granulación que se halla infiltrado por granulocitos y alrededor una capa fibrosa.

Las lesiones nodulares viejas, ya perforadas, tienen un orificio rodeado de tejido epitelial pavimentoso-estratificado que se extiende internamente hasta el fondo de la cavidad; debajo se ha formado tejido conjuntivo fibroso con granulocitos y en él también pueden hallarse focos hemorrágicos (Marcato, 1990). La abertura externa, cuando se forma mide sólo 1-2 mm y posteriormente 5-6 mm. Al poco tiempo de salir la L-3 se cierra el orificio con tejido granuloso cicatricial aunque, a veces, los restos del parásito retrasan su cicatrización. A los 65 días ya existe una cicatriz formada por tejido fibroso. Ocasionalmente, en los nódulos se produce una calcificación, haciéndose más persistentes en el dorso del animal.

2.6.- EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO

2.6.1.- LA PIEL COMO ÓRGANO DEL SISTEMA INMUNE

El tejido cutáneo constituye la principal barrera física entre el organismo y el medio exterior. Pero, además, participa activamente en la defensa del huésped, y tiene capacidad para generar y estimular las reacciones inmunitarias e inflamatorias locales. Muchos antígenos extraños penetran en el organismo a través de la piel, de forma que gran parte de las respuestas inmunitarias se inician en este tejido.

La piel está integrada por dos láminas, una externa, la epidermis, y otra interna, la dermis, que descansa sobre un tejido conectivo laxo denominado hipodermis.

La epidermis se compone en su mayoría por queratinocitos y melanocitos y en ella encontramos las siguientes capas:

1) Estrato córneo: formado por células planas queratinizadas anucleadas, también llamadas células córneas. Esta capa se distingue como la más gruesa y eosinófila.

2) Estrato lúcido: se caracteriza por tener una zona muy delgada de características eosinófilas. Los núcleos comienzan a degenerar en las células externas del estrato granuloso y desaparecen en el estrato lúcido.

3) Estrato granuloso: se compone de 4 a 5 capas de células aplanadas, el citoplasma contiene gránulos basófilos.

4) Estrato espinoso: está compuesto por células con forma poligonal, los núcleos son redondos y el citoplasma posee características basófilas. Tiene un mayor contenido de tonofibrillas que las del estrato germinativo.

5) Estrato germinativo: se compone de una capa de células cilíndricas bajas, su citoplasma demuestra la presencia de tonofibrillas, además las células de dicho estrato se relacionan con la unión desmosómica.

La dermis se caracteriza por la abundancia de fibras de colágeno y elásticas que se disponen de forma paralela y que le dan a la piel su consistencia y elasticidad característica. Histológicamente se divide en 2 capas:

1) Estrato papilar: compuesto por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III, y asas capilares.

2) Estrato reticular: compuesto por tejido conectivo denso, fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas, en donde se encuentran mastocitos, reticulocitos y macrófagos.

La hipodermis es la capa más profunda de la piel, está constituida por tejido conectivo laxo que es la continuación en profundidad de la dermis. Sus fibras colágenas y elásticas se conectan directamente con las de la dermis, orientadas en todas las direcciones aunque principalmente de forma paralela a la superficie de la piel. El estrato subcutáneo está recorrido por numerosos vasos sanguíneos y troncos nerviosos; contienen muchas terminaciones nerviosas. La hipodermis se divide en 2 capas:

1) Superficial: Es la capa más externa y está en contacto con la dermis, las células más características son los adipocitos globulares y extensos, situados verticalmente y los vasos sanguíneos son muy numerosos.

2) Profunda: Es la más interna, las células son fusiformes, pequeñas y se distribuyen horizontalmente.

La inmunidad innata, también conocida como natural, es la protección con la que el animal nace, se considera la primera línea de defensa y está compuesta por células que reaccionan inespecíficamente contra ciertos antígenos, e incluye barreras naturales como la piel y las mucosas. Este tipo de respuestas carece de memoria inmunológica y entre las células de la epidermis existen sistemas de reconocimiento que pueden dispararse y producir o activar varios agentes antiinfecciosos, como los factores de complemento de las vías clásica y alterna, los péptidos antimicrobianos (Castrillón y col., 2007; Ganz, 2003), las citoquinas, las quimiocinas, radicales libres de oxígeno y óxido nítrico (NO), etc. Existen otras funciones protectoras asociadas al

estrato córneo de la piel, como son la capacidad de recuperación derivada del movimiento mecánico, así como su pH ácido.

El término sistema inmune cutáneo (SIC) fue propuesto por Bos y Kapsenberg (1986) para describir las complejas interacciones inmunológicas entre las células y determinados factores humorales existentes en la piel. El SIC se compone de elementos estáticos, formados por las células que son parte anatómica de la estructura de la piel, entre las que se encuentran los queratinocitos, los fibroblastos y las células endoteliales, las cuales proporcionan la base de las reacciones inmunitarias y producen citoquinas proinflamatorias; y, también, de componentes dinámicos, como los leucocitos, y las células presentadoras de antígeno (células de Langerhans, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T) que tienen un tiempo limitado de permanencia en la piel (Daynes y col.,1985). Hay que destacar que la epidermis no tiene acceso directo a la sangre o linfa; no obstante existe una complicada red de citoquinas que se encargan de coordinar las interacciones entre queratinocitos, células de Langerhans, linfocitos T, células de la dermis y nódulos linfáticos regionales (Bos y Kapsenberg, 1993). Las citoquinas son recogidas por los vasos de la dermis superficial y, distribuidas sistémicamente (Salmon y col., 1994). En los nódulos linfáticos que drenan la piel se produce la interacción entre los linfocitos inmunocompetentes y las células presentadoras de antígenos, especialmente las células de Langerhans que han emigrado desde la epidermis.

En la piel normal, la mayor acumulación de células relacionadas con la respuesta inmune se encuentra en la región perivascular de las vénulas post-capilares en la dermis papilar y profunda (Bos y Kapsenberg, 1993). En caso de inflamación cutánea las poblaciones de estas células aumentan significativamente. Las células endoteliales de la microvasculatura dérmica poseen un papel clave en la respuesta inmune cutánea mediante la producción de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas implicadas en el transporte de leucocitos entre la dermis y epidermis.

Los **queratinocitos** son las células más abundantes en la epidermis (90%) y durante mucho tiempo fueron considerados simplemente como una barrera inerte esencial para mantener la homeostasis (Salmon y col., 1994); sin embargo, hoy en día se sabe que tienen una función activa en las reacciones inmunológicas e inflamatorias y son una fuente importante de citoquinas (Pivarcsi y col., 2005). Su principal función es la síntesis de queratina, colágeno y factores de crecimiento; además, expresan moléculas de adhesión que regulan el movimiento de células a través de la piel. Se ha

propuesto que los queratinocitos y sus productos (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF-α y TGF-β) son los encargados de transformar los estímulos externos en señales internas.

Las **células de Langerhans** son una forma de células dendríticas derivadas de la médula ósea que se localizan en la porción suprabasal de la epidermis y dermis. A pesar de su escaso número forman una red casi continua que les permite captar antígenos que penetran a través de la piel (Hume y col., 1983). Son la principal vía de presentación de antígenos a los linfocitos vírgenes y de memoria, y son las únicas células de la epidermis que expresan MHC II. Una vez activadas por el antígeno, migran a través de la dermis y pasan a los vasos linfáticos aferentes y ganglios linfáticos regionales, donde se convierten en células dendríticas interdigitantes y allí presentan el antígeno a las células T CD4+ vírgenes que han entrado en el ganglio desde la sangre. Estas células también producen citoquinas importantes para la regulación de la respuesta inmune cutánea.

Los **linfocitos** se encuentran en pequeñas proporciones en la epidermis (2%), siendo más abundantes en la dermis. Los linfocitos T activados tienen preferentemente una localización perivascular, lo cual es característico de la piel normal y reflejo del reconocimiento permanente del antígeno en el endotelio o de la activación continua de las células endoteliales por medio de las células T, que inducen el aumento de la eliminación del antígeno por el endotelio de la piel. La mayoría de células en la linfa aferente que drena la piel son células T de memoria CD4, que recirculan preferentemente a través de los tejidos finos periféricos y células T γδ características de la piel (MacKay, 1992).

Los **macrófagos** se encuentran dispersos en la dermis y están relacionados con las respuestas de inmunidad innata en los procesos de fagocitosis y muerte de los agentes extraños. Son células presentadoras de antígeno por lo que participan en la inmunidad adaptativa. Aunque son células residentes, aumentan en número después de daño y son atraídas por mediadores de la inflamación. Además de citoquinas, producen mediadores inflamatorios.

La respuesta primaria a la infección en la piel se inicia cuando las células de Langerhans contactan el antígeno y lo vehiculan al ganglio linfático local. Dentro del ganglio linfático las células de Langerhans, transformadas en células dendríticas, pueden presentar el antígeno a las células T vírgenes y en menor medida también se expresa por las células MHC para a continuación iniciar la respuesta inmunitaria primaria (Austyn y Larsen, 1990; Bujdoso y col., 1990: Austyn, 1992).

En un estudio realizado en piel normal de bovino, Hein y Dudler (1997) observaron que la mayoría de las células T (82,6%) se localizaban en los primeros 0,5 mm de la capa superficial de la dermis. Solamente el 3% estaba en contacto con la epidermis y el 14,3% se distribuía en la capa más profunda de la dermis. Estos autores encontraron que el 44% de las células T expresaban el marcador TCR-γδ, y el 39% y 35%, el CD4 y CD8, respectivamente, si bien detectaron algunas células T γδ que también expresaban el marcador CD8 y otra pequeña población que expresaba CD4 y CD8. El cociente CD4/CD8 en piel normal de bovino es de 1:1.

En piel normal de ovejas, McElroy y col. (1998) observaron que el cociente CD4/CD8 variaba entre 1:1 y 1:1,65 dependiendo del área analizada. Al considerar la edad de los animales, el número de células aumentaba de forma significativa en las ovejas de más edad y su distribución se centraba en la dermis superficial, rodeando los vasos sanguíneos, si bien una pequeña cantidad se encontraban en la epidermis rodeando los folículos pilosos. Al considerar las diferentes poblaciones destacaron las células T γδ y los CD4, siendo los linfocitos B muy escasos.

Estudios anteriores en ovejas también encontraron que las células T γδ eran la subpoblación predominante en la superficie de la piel (Hein y Mackay, 1991; Watson y col., 1994). La función exacta de estas células es desconocida, se ha postulado que representan una población primitiva de células de vigilancia que proporcionan la respuesta temprana de la inmunidad celular, particularmente en las superficies epiteliales.

2.6.2.- RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA FRENTE A UNA INFESTACIÓN POR ECTOPARÁSITOS

El contacto entre un ectoparásito y su hospedador ocurre a través de la piel, por este motivo la respuesta inmune cutánea resulta de vital importancia para el desarrollo de la infestación.

En las respuestas humorales de los hospedadores contra antígenos de los artrópodos, llama la atención el hecho de que los anticuerpos IgE e IgG1 sean inducidos con mayor frecuencia que otros anticuerpos, y esto probablemente sea el reflejo de que la mayoría de antígenos de artrópodos son introducidos al hospedador a través de la piel.

La información existente sobre las manifestaciones de la respuesta inmune celular es escasa y hace referencia sobre todo a las **reacciones de hipersensibiliad**. Las reacciones de hipersensibilidad o alergia a antígenos de artrópodos varían ampliamente entre las especies de hospedadores, entre los individuos de una misma especie y entre las especies de artrópodos involucrados. Generalmente hay dos tipos de hipersensibilidad hacia antígenos de artrópodos hematófagos, caracterizadas por reacciones inmediatas y tardías (Benjamini y Feingold, 1970).

La respuesta inmunitaria típica mediada por células T se denomina hipersensibilidad de tipo retardado o tipo IV en la que la célula efectora final es el fagocito mononuclear activado (macrófago). Se trata de una reacción frente a antígenos solubles o sustancias químicas que pueden unirse a proteínas propias o modificarlas, creando nuevos determinantes antigénicos. Así, utilizando células del bazo de conejos sensibilizados con antígenos de *Aedes aegypti*, se han podido transferir reacciones de hipersensibilidad, tipos I y IV (Allen, 1966). En caballos se han observado respuestas de hipersensibilidad tipo IV al inocular intradérmicamente un extracto de *Culicoides imicola* en animales sensibilizados naturalmente (Braverman y col., 1983). Del mismo modo, se ha demostrado que en ratones parasitados con el ácaro *Myocoptes musculinns* ocurren reacciones de hipersensibilidad tipo IV al inocular extractos del parásito (Laltoo y col. 1979). En bovinos parasitados con *Dermacentor andersoni* se observó una reacción de hipersensibilidad tipo IV en la piel al inocular por vía intradérmica un extracto obtenido de las glándulas salivales de la garrapata (Wikel y Allen, 1976; Wikil y Osburn, 1982).

van den Broek y col. (2003) demostraron que la infestación por *Psoroptes ovis* genera respuestas de hipersensibilidad retardada con un infiltrado rico en eosinófilos. No obstante, Wikel (1984) y Kenyon y col. (2003) vieron que la respuesta inmunitaria en la infestación por este artrópodo se debía fundamentalmente a una reacción de hipersensibilidad inmediata o tipo I.

Otro signo característico de las infestaciones por artrópodos es la **dermatitis**. Así la infestación por *Psoroptes ovis* causa una dermatitis con un intenso prurito y un infiltrado inflamatorio dominado por los eosinófilos y por un número más reducido de neutrófilos y de mastocitos (Rovere y Nunez, 1977; Stromberg y Fisher, 1986; Rosa y Moschini, 1988; van den Broek y col., 2000). En ganado vacuno y ovino, la infiltración también incluyó un número substancial de linfocitos (Stromberg y Fisher, 1986; Rosa y Moschini, 1988).

Pruett y col. (1998) indujeron una reacción de dermatitis alérgica inyectando antígeno del ácaro, esta reacción fue caracterizada posteriormente por van den Broek y col. (2000; 2004) y van den Broek y Huntley (2003) encontrando una infiltración masiva de eosinófilos a las 24 h.p.i. Estos autores comprobaron que esta reacción eosinofílica no reduce la expansión de la lesión ni controla el número de ácaros en la zona. Teniendo en cuenta esta teoría, Bellworthy y col. (1997) especularon con que el ácaro estaba directamente relacionado con el reclutamiento de estas células con el fin de promover su mantenimiento en la lesión y lo demostraron al comprobar que la administración de un corticoide (dexametasona) en la zona lesionada provocaba una reducción en el número de ácaros.

Huntley y col. (2005) observaron además de una afluencia rápida de eosinófilos una apoptosis de los queratinocitos, de las células del folículo piloso y de las células sebáceas, localizada fundamentalmente en la epidermis. Además, en algunas secciones de estas lesiones se encontraron pústulas localizadas en el estrato córneo en las que había un importante número de eosinófilos.

van den Broek y col. (2004) encontraron además un aumento en los niveles de mastocitos a las 96 h.p.i., y las lesiones se encontraban a nivel epidérmico siendo especialmente marcadas entre las 24 y 96 h.p.i. Así mismo, observaron edema intercelular tras 24 horas, el cual se asociaba a una degeneración hidrópica de las células del estrato basal y espinoso de la piel de los animales parasitados. Cuatro días después de la infestación encontraron una hiperqueratosis difusa acompañada de hipergranulosis, hiperplasia epidérmica y una marcada acantosis; en este momento, también hallaron el nivel máximo de mastocitos y basófilos localizados en el margen de las lesiones. Para estudiar el efecto de la respuesta inmunitaria adaptativa se centraron en los bordes de la lesión observando, que el mayor incremento de las células mastocitarias se producía a los 21 días, mientras que el de eosinófilos y neutrófilos se encontraba de forma más tardía, a los 63 días. El patrón de la infiltración celular era tipícamente difuso, superficial y de distribución perivascular y aunque mayoritariamente se localizaba en la dermis superficial también se hallaron en la dermis profunda. Las áreas focales de la infiltración eosinofílica se extendían con frecuencia hasta la base de los folículos pilosos, salvo en la dermis profunda donde esta infiltración era escasa. Estas células, características de una infección parasitaria, se encontraron fundamentalmente en el borde de la lesión y aumentaron desde las 24 horas hasta los 63 días. Las lesiones más intensas se detectaron a partir del día 42-63 post-infestación y no se detectaron indicios de cicatrización hasta 84 días después.

Estos autores, confirman de este modo, que en la infestación por este ácaro se desarrolla una respuesta inmunitaria temprana que se ve sustituida por una respuesta adaptativa, relacionándose la intensidad de ésta con el número de ácaros presentes en la zona.

En un estudio posterior, estos autores caracterizaron distintas poblaciones linfocitarias, así en la piel normal de ovejas las células T γδ eran los linfocitos más abundantes seguidos por los linfocitos B, mientras que las células dendríticas y los linfocitos CD4 se encontraron con menos frecuencia. Los CD8 eran muy escasos. Todas estas células se localizaban en la dermis con una distribución perivascular. No hubo ningún aumento significativo en los CD8 siendo el ratio CD4/CD8 a los 49 días de 70/1. Después de 21 días el número de células T γδ descendía, pero los CD4, linfocitos B y células dendríticas seguían siendo relativamente altos. A los 63 días el recuento de las células en piel normal y lesionada no mostraban diferencias, salvo en los linfocitos B que seguían siendo significativamente más altos. Los linfocitos CD4, γδ, y B se localizaban perivascularmente en la dermis superficial, con un número menor en la dermis profunda. Las células dendríticas eran probablemente células de Langerhans y se localizaban en la epidermis aunque la mayoría estaban en la dermis superficial, mientras que los CD8 estaban dispersos aleatoriamente a través de la dermis superficial y profunda (van den Broek y col., 2005).

En la infestación por artrópodos hematófagos, si bien el contacto entre el parásito y el hospedador es reducido, hay una respuesta inmune por parte de este último. Brown (1982), al infestar ratones con *Amblyomma americanum,* observó que en la respuesta celular cutánea inicial predominaban los neutrófilos, y en fases posteriores son sustituidos por basófilos.

Mclaren y col. (1983), estudiando la respuesta cutánea en conejillos de indias infestados por *Rhipicephalus appendiculatus,* comprobaron que la respuesta primaria temprana estaba caracterizada por células mononucleares, siendo la mayoría fibroblastos activados. En las áreas lesionadas las células predominantes eran los basófilos que comenzaron a infiltrar la dermis a las 6 h.p.i. y mostraron evidencias de degranulación a las 12 horas. Por el contrario, en un estudio similar, Brown y col. (1983) comprobaron que que en las lesiones tempranas (6 h.p.i.) predominaban los eosinófilos (44%), mientras que los basófilos eran dominantes a las 96 horas con un porcentaje del 61-91%.

En la infestación experimental por *Ixodes ricinus* en ratones, Mbow y col. (1994), en muestras de piel congeladas, observaron que en los testigos aparecía un número muy reducido de CD4 y CD8 que se hallaban fundamentalmente en la dermis de la zona lesionada; también observaron una pequeña población de células dendríticas y macrófagos localizados fundamentalmente en la epidermis. En ratones primoinfestados, el número de CD4 y CD8 fue mayor y los CD4 excedían a los CD8 con un cociente 2,2. En los animales reinfestados por segunda y tercera vez observaron niveles significativamente más elevados de CD4 y CD8 con un cociente de 3,2 en la infestación secundaria y 4,7 en la terciaria. Tanto en los ratones primo como reinfectados no detectaron linfocitos B.

Addul-Amir y Gray, (1987), al analizar la infestación por garrapatas en ovejas, comprobaron que el infiltrado inflamatorio a nivel cutáneo estaba compuesto principalmente por neutrófilos y eosinófilos; no obstante, el incremento de estos últimos durante las primoinfestaciones y reinfestaciones seguía patrones similares. Del mismo modo, Nelson y Kobud (1980), al estudiar los melófagos en ganado ovino, tampoco encuentran un incremento significativo de estas células en los animales reinfestados.

Boppana y col. (2004) estudiaron la respuesta inmunitaria en ovejas parasitadas por garrapatas, comprobando un aumento del ratio CD4/CD8 y un descenso del cociente linfocitos T/B.

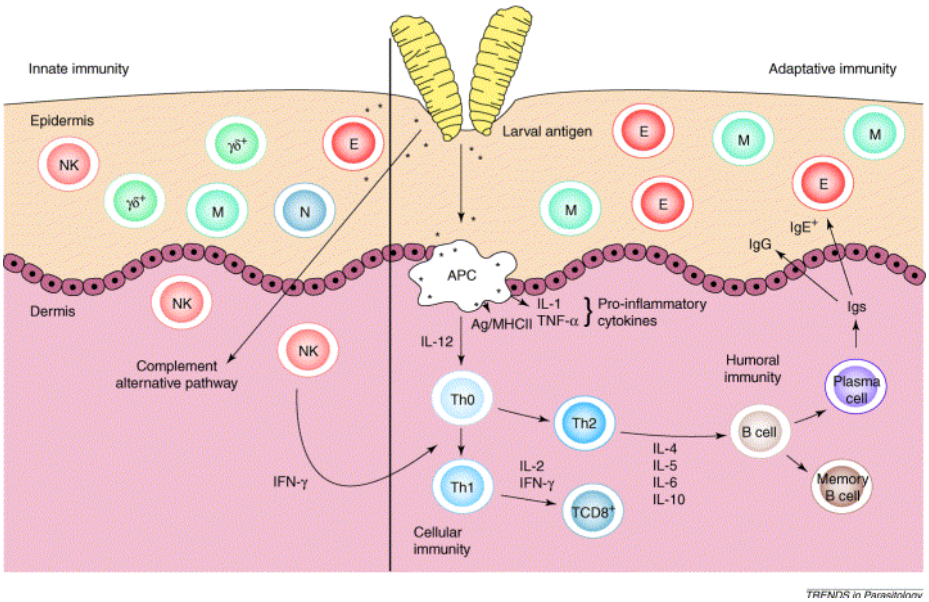
En el caso de los piojos, Shu y col. (2009) comprobaron en corderos infestados con *Bovicola ovis* que la inyección intradérmica del antígeno provocó respuestas inmediatas y tardías. Los niveles de MHC tipo II+, células CD1b+, IgE+, y de los eosinófilos eran más altos que en los corderos sanos. Las células de Langerhans estaban presentes en la epidermis de todas las muestras y se distribuían a lo largo de toda la epidermis superficial y sus dendritas se extendían hasta el estrato córneo.

En ganado vacuno la infestación con *Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus* provocó un infiltrado inflamatorio perivascular formado por eosinófilos y células mononucleares que afectaba a la dermis superficial y rodeaba a los capilares sanguíneos adyacentes a los folículos pilosos. Con respecto a las diferentes poblaciones celulares las cifras de CD3, CD4 y MHC de tipo II en las vacas infestadas, fueron significativamente superiores a las sanas (Milnes y col., 2007)

Finalmente, en lo que respecta a las **miasis**, Broadmeadow y col. (1984) y Bowles y col. (1992) caracterizaron la respuesta celular cutánea en la infestación por *Lucilia cuprina* y observaron en el lugar lesionado un número elevado de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, y linfocitos T CD4, CD8 y γδ TCR. Este infiltrado es típico de las inflamaciones y el gran número de células T sugiere el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa. En un trabajo posterior, estos autores estudiaron la respuesta celular en ovejas primoinfestadas y reinfestadas. En la infección primaria la respuesta se caracterizó por un aumento en las células CD4 sobre las de tipo CD8 durante las primeras 48 h.p.i., mientras que a las 72 horas los CD8 superaban a los CD4. En las reinfestaciones el aumento de los CD8 era más pronunciado y más precoz. Los porcentajes de linfocitos B aumentaron tras 96-120 h.p.i. en ambos grupos de animales (Bowles y col., 1994).

Bowles y col. (1996) en ovejas vacunadas frente a *L. cuprina* observaron focos celulares inmediatamente debajo de la epidermis y en la dermis, siendo la mayoría células T CD4, γδ y células CD1 o de Langerhans. En cuanto a la distribución las células T γδ se hallaban generalmente en la epidermis, los linfocitos CD4 y las células que expresaban el MHC tipo II eran especialmente abundantes en los focos de inflamación mientras que, de forma ocasional, encontraron linfocitos B, lo cual indicaba una producción local de anticuerpos. Estos autores sugirieron una protección local muy importante debida fundamentalmente a esta respuesta celular (Esquema 1).

Colditz y col. (1994) y Elhay y col. (1994) demostraron el importante papel de la respuesta inmune para determinar la resistencia o receptividad a la infección por *Lucilia*. Así, en los animales receptivos, hay un aumento en el número de células T γδ y eosinófilos, mientras que, en animales considerados resistentes, se observó un incremento de células IgE^+, que podrían jugar un papel importante en la resistencia a padecer lesiones por esta mosca.



Esquema 1.- Respuesta inmune cutánea (innata y adaptativa) estimulada durante la infestación por *Lucilia cuprina*. (Tomado de Otranto, 2001).

Siguiendo con esta parasitosis, Colditz y col. (1996) estudiaron la respuesta celular en el lugar de entrada de las larvas y también a nivel sistémico; determinaron el efecto del infiltrado celular en el crecimiento y supervivencia de las larvas inyectando intravenosamente anticuerpos monoclonales anti CD4, CD8, IgG2a e IFN-γ, usando para ello ovejas resistentes y sensibles frente a esta miasis. Los resultados obtenidos sugirieron que la respuesta celular y, en concreto, las poblaciones de linfocitos T contribuyen a la menor incidencia de esta enfermedad en las ovejas resistentes.

Nash y col. (1996), en ovejas infestadas por *Lucilia cuprina*, hallaron una respuesta inflamatoria aguda temprana, caracterizada por una infiltración de polimorfonucleares acompañada por un número reducido de linfocitos en las áreas cercanas a la lesión larvaria. La infiltración se caracterizó por gran cantidad de neutrófilos, eosinófilos y células MHC II (macrófagos/células de Langerhans). En el punto de entrada de las larvas observaron un aumento importante de CD4 y de células T γδ, pero no de los CD8.

Oliveira-Sequeira y col. (1996) observaron gran cantidad de eosinófilos en el infiltrado inflamatorio que rodeaba a las larvas de *Dermatobia hominis,* y detectaron también inmunoglobulinas G y M alrededor de las larvas muertas en la dermis de las vacas. En esta zona hallaron concentraciones altas de antígeno larvario que estimularían la respuesta inmunitaria humoral y celular local.

En condiciones óptimas, en la mucosa de las vías respiratorias superiores se desencadena una rápida respuesta inflamatoria local frente a la agresión parasitaria provocada por larvas de *Oestrus ovis* (Dorchies, 1997). Esta respuesta juega un papel importante en la interacción parásito-hospedador, ya que ralentiza el desarrollo de las larvas y aumenta su mortalidad, lo que se traduce en disminución de la carga parasitaria (Nguyen y col., 1999; Cepeda-Palacios y col., 2000). De acuerdo con Nguyen y col. (1996), Tabouret y col. (2003) y Jacquiet y col. (2005) la presencia de *O. ovis* en la mucosa de las vías respiratorias determina el aumento local del número de linfocitos T y B, macrófagos, eosinófilos y mastocitos, y una reducción en la circulación general. Estas reacciones inflamatorias locales provocan además un aumento de la permeabilidad de la mucosa, lo que favorece el paso de proteínas plasmáticas, que juegan un papel esencial en el desarrollo de la inmunidad específica, porque reconocen los antígenos y segregan una serie de citoquinas que provocan la liberación de mediadores de la inflamación; como consecuencia, la mucosa se transforma en un ambiente desfavorable para las larvas, que tienden a alejarse del lugar donde se habían fijado, aumentando así las posibilidades de su expulsión (Dorchies, 1997; Tabouret y col., 2003). La estimulación de la producción de IgG e IgA específicas frente al parásito, la ejercen los antígenos de las glándulas salivares de las larvas y en menor medida los productos antigénicos presentes en su tracto digestivo.

Yacob y col. (2004) en ovejas con infección experimental por *Oestrus ovis*, comprobaron que se desarrollaba una inflamación de las mucosas, que afectaba no solo a la mucosa nasal sino de otras anatómicamente distantes. Según estos autores, la reacción inflamatoria “a distancia” influye en el desarrollo de otras infecciones posteriores por ejemplo con *Trichostrongylus colubriformis* en la mucosa intestinal.

2.7.- RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Hypoderma* spp.

Las larvas 1 de *Hypoderma* emprenden una larga migración por el tejido conectivo laxo profundo del ganado bovino, donde se exponen continuamente a los mecanismos de defensa del hospedador. Su supervivencia depende en parte de la evasión de las respuestas del hospedador y de la modulación de su sistema inmunitario.

2.7.1.- RESPUESTA INMUNE NATURAL

Weintraub y col. (1961) comprobaron la existencia de resistencia innata en terneros infestados por *Hypoderma*. Esta resistencia, localizada fundamentalmente en la piel, está asociada al aporte de vitamina A y produce una mortalidad de un 65-75% de las larvas en el momento de la penetración. A medida que los terneros crecen, la resistencia innata va disminuyento y va siendo reemplazada por la resistencia adquirida, originada a partir del primer contacto con el parásito (Gingrich, 1980).

Boulard y Bencharif (1984) pusieron en evidencia la actividad inhibidora de las hipoderminas A y B sobre el complemento hemolítico bovino, lo que permite al parásito eludir la reacción temprana de defensa del hospedador; debido a su importancia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, esta actividad es más intensa en los animales jóvenes que en los adultos infestados con anterioridad. Posteriormente, Boulard (1989) y Baron (1987) precisaron su mecanismo de acción degradando el factor C_3 que controla el inicio de la respuesta inflamatoria y de la reacción inmune en ganado no infestado previamente, lo que contribuye sin duda a inhibir o atenuar estas reacciones y asegurar la supervivencia de las larvas en el hospedador. Consecuentemente, la supervivencia de las larvas en terneros es mayor que en animales de más edad. Baron (1990) señala que la hipodermina A es la más eficiente en la degradación del C_3 bovino, ya que es capaz de degradar las cadenas α y β.

2.7.2.- RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA

La resistencia adquirida comienza a desarrollarse a partir de la primera infestación del hospedador (Gingrich, 1980), pero no alcanza su máxima eficacia hasta la tercera o cuarta infestación, apreciándose un descenso, en algunos casos muy notable, del

número de barros en el dorso del animal, así como una disminución de la viabilidad en relación con las anteriores parasitaciones (Gingrich 1982; Pruett y Barrett, 1985; Baron y Weintraub, 1987b).

Por lo tanto, la respuesta del hospedador será distinta en función de que se trate de una primoinfestación o de una reinfestación. Desde hace tiempo se sabe que los animales de más edad, que ya han sufrido infestaciones por *Hypoderma*, presentan ligeras tumefacciones y pequeños exudados en el lugar de penetración de las larvas, a la vez que muestran un número sensiblemente inferior de barros en el dorso que los más jóvenes.

Weintraub y col. (1961) demostraron que el número de larvas llegadas al dorso era inversamente proporcional al número de larvas infestantes, es decir, que a mayor número de huevos, menor número proporcional de barros y por lo tanto una mayor mortalidad larvaria, como consecuencia de la intensidad de la respuesta inmune.

Entre los factores más influyentes en la resistencia está también la intensidad de parasitación, el número de reinfestaciones previas y el empleo de insecticidas. De esta forma, animales que tuvieron una importante infestación un año, fueron menos receptivos al siguiente, por el contrario, animales débilmente infestados o tratados precozmente con un insecticida, sufrieron infestaciones más fuertes la temporada siguiente (Evstafjev, 1980).

2.7.2.1.- RESPUESTA INMUNE CELULAR

Gingrich (1982) sugirió la participación de un componente celular en el desarrollo de la resistencia adquirida frente a la hipodermosis, puesto que observó que los animales más resistentes a la infestación tenían, un mes después de la infestación, actividad MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) más elevada que los escasamente resistentes, al tiempo que presentaban mayor sensibilidad a los antígenos de las larvas que penetraban en la piel.

Posteriormente, varios autores (Colwell, 1985 y Baron y Weintraub, 1987a), en animales resistentes previamente infestados, obsevaron correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular y su estado de protección. De este modo, Baron y

Weintraub (1987a) detectaron "*in vitro*" una respuesta linfoproliferativa antígeno-específica que variaba con las fases de la infestación y que se correlacionaba positivamente con la resistencia del hospedador, lo que sugería que la resistencia adquirida poseía una base celular con participación de linfocitos B y T. Así pues, en animales reinfestados, la respuesta celular es intensa durante los dos meses posteriores a la infestación, coincidiendo con la migración de las L-1 hacia los lugares de reposo y se mantiene relativamente baja con la permanencia de las L-1 en estas localizaciones, para intensificarse de nuevo cuando reanudan su migración hacia el dorso y forman los nódulos larvarios. Sin embargo, en animales primoinfestados esta reacción inmunitaria de base celular es más tardía y se relaciona también con la mortalidad larvaria en el hospedador, sobre todo la que se produce en el dorso.

Durante la invasión de la piel, la intensidad de la respuesta celular eosinofílica aumenta con el número de exposiciones anteriores, observándose en el trayecto de entrada en animales reinfestados la presencia de un abundante exudado eosinofílico próximo al extremo posterior de la larva. Al mismo tiempo, existe una rápida elevación del nivel de eosinófilos en sangre que alcanza un máximo entre los 7-20 días de la entrada de la larva (Nelson y Weintraub, 1972; Nelson, 1987 y Colwell, 1987); estos niveles se mantienen relativamente altos durante la fase migratoria (Colwell, 1987), para volver a elevarse coincidiendo con la aparición de las larvas en el dorso.

Nelson y Weintraub (1972) y Colwell (1987) encuentran una relación inversa entre la supervivencia larvaria en animales previamente infestados y los niveles de eosinófilos.

Doby y col. (1987) en casos de hipodermosis humana, observaron que la hipereosinofilia se mantiene mientras las larvas poseen una actividad secretora-excretora en los tejidos profundos y el número de eosinófilos es de nuevo normal cuando cesa esa actividad, es decir, cuando las larvas son destruidas por las reacciones serológicas y tisulares del organismo.

Colwell (1985) demostró una correlación entre el nivel de eosinófilos circulantes, en animales previamente infestados, y el grado de resistencia. Así mismo, Panadero (1996) relacionó estadísticamente, los niveles de anticuerpos con el número de eosinófilos circulantes durante el ciclo de *Hypoderma lineatum*. De esta forma comprobaron que los niveles de anticuerpo se relacionaban con el ciclo, y precedían a la aparición del número máximo de barros, en el mes de marzo, para posteriormente descender rápidamente. La evolución de los eosinófilos circulantes fue paralela a la

respuesta humoral, con un incremento durante la migración intraorgánica, para llegar al nivel máximo en el mes de diciembre, lo cual coincidía con el inicio de la llegada de las larvas 3 al dorso del animal.

La proliferación de linfocitos (Baron y Weintraub, 1987) y la tasa de neutrófilos (Romaniuk, 1974) siguen curvas paralelas, incrementándose al inicio de la migración, para elevarse de nuevo durante la migración al dorso.

Los resultados obtenidos por Pruett (1993) demuestran que la hipodermina A es capaz de desdoblar la inmunoglobulina G (IgG) *in vitro,* dando lugar a un fragmento $(fab)'_2$, mientras que los fragmentos de la cadena larga asociados al desdoblamiento de la fracción F_c permanecen inalterados. La hipodermina A no sólo degrada las IgG bovinas, sino también las de otras especies, así como otras proteínas del ganado vacuno; además puede inactivar macrófagos y otras células implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune. La destrucción de la actividad biológica de las IgG bovinas sugiere un mecanismo de posible evasión que puede contribuir a la supervivencia de las L-1 en el hospedador.

Colwell (1991) sugiere la presencia en la superficie de las larvas 1 de *H. lineatum* de compuestos que tenderían a reducir la actividad de las respuestas inflamatorias del hospedador, con el consiguiente retraso en la instauración de la respuesta inmune.

El descubrimiento de que los antígenos derivados de las L-1 de *H. lineatum* estimulan la resistencia del hospedador a la infestación ha promovido su uso para estudiar el desarrollo de vacunas con las que proteger artificialmente al ganado frente a la infestación por *Hypoderma* spp. Así, Magat y Boulard (1970) revelaron la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria utilizando como antígeno la fracción colagenasa obtenida a partir de L-1 de *H. lineatum* y parcialmente purificada. Esta inmunidad aunque supuso una disminución en el número de barros, tanto en infestaciones por *H. bovis* como por *H. lineatum*, se mostró incompleta.

Boulard y Lecroisey (1982) ensayaron un método rápido y simple para la producción de anticuerpos específicos en conejos por inmunización directa con tiras de poliacrilamida que contienen pequeñas concentraciones de proteína. La desnaturalización de la proteína mediante SDS no modifica su antigenicidad y por otra parte los geles de poliacrilamida químicamente son inertes y no inducen una reacción inmune en el conejo.

Baron y Weintraub (1986) inmunizaron un grupo de vacas con un extracto larvario obtenido de las L-1 de *H. lineatum* (antígeno somático) y a otro grupo con el sobrenadante procedente de un cultivo de las mismas (antígeno de excreción-secreción). Ambos tratamientos redujeron en un 50% el número de barros respecto a los testigos no inmunizados; la supervivencia de las larvas de *H. lineatum* se redujo significativamente con el antígeno somático, mientras que la de *H. bovis* se vio afectada con ambos extractos.

Pruett y col. (1987), en ganado bovino primoinfestado y vacunado con hipodermina A, consiguieron una mortalidad larvaria del 89,9%, mientras que en los primoinfestados no vacunados sólo fue del 35%. Esta mortalidad superó incluso a la obtenida en animales sometidos a varias infestaciones (60,9%). Esta resistencia se mantenía durante más de un año después de la vacunación.

La hipodermina A se considera como la más inmunógena; en este sentido, Pruett y col. (1989) demostraron que la disminución en el número de larvas viables era mayor cuando la inmunización se llevaba a cabo con la hipodermina A purificada que si se utilizaba una mezcla de hipoderminas B y C.

Chabaudie y col. (1991) ensayaron distintos protocolos de vacunación, empleando hipodermina A sola o combinada con el adyuvante incompleto de Freund; sin embargo, incluso con este protocolo de vacunación, se inducía una protección muy incompleta ante la infestación natural.

Baron y Colwell (1991a) observaron como animales inmunizados con una combinación de hipoderminas A, B y C a la que se añadía un inmunoestimulante, el MPL (monophosphoril lipid A), desarrollaban una respuesta celular antígeno-específica y humoral más marcada que la de los testigos infestados, y que se relacionaba con el grado de protección de esos animales.

Fisher y col. (1991) comprobaron que la hipodermina A induce una respuesta blastogénica linfocítica como resultado de la vacunación y/o infestación; sin embargo, no observaron correlación entre la magnitud de la respuesta antígeno-específica, la linfoproliferación periférica y la mortalidad larvaria.

Godon (1994) observan que la HA y HB inhiben la actividad quimiotáctica de los neutrófilos *"in vitro"* y Chabaudie (1987) comprueba que también se inhibe *"in vivo"*,

mientras que Barquet y col. (1992) afirman que modulan la expresión de las moléculas implicadas en la migración y reclutamiento de los neutrófilos.

Chabaudie y Boulard (1992) sugirieron que la HA es la proteína larvaria con mayor actividad inhibidora sobre el sistema inmune del hospedador. De acuerdo con Nicolas-Gaulard y col. (1995) esta inmunosupresión provocada por la HA puede ser debida a un aumento del nivel de prostaglandina E_2 (PGE_2), molécula con fuerte capacidad antiproliferativa, secretada por monocitos y macrófagos. Además, Tarleton (1988) comprobaron que la PGE_2 inhibía la secreción de IL-2 e IFN-γ) por las células mononucleares durante la infección experimental con protozoos parásitos como *Leishmania* spp. o *Trypanosoma cruzi.*

Moiré y col. (1997) observaron que la hipodermina A interfiere en la unión de algunos anticuerpos monoclonales (CD2, CD5, CD4, CD8, CD18) a la superficie de linfocitos y monocitos, lo que podría deberse a su acción enzimática, degradando algunos epítopos de estas moléculas aunque no la molécula completa. En un estudio posterior, comprobaron que determinados epítopos de la membrana de los linfocitos, necesarios para la activación y proliferación, eran degradados por la HA (Moiré y col., 1997).

Khaznadji y col. (2003) compararon la HA natural y recombinante observando que la HA natural reduce en un 70% los linfocitos tipo CD4 y en un 90% los CD5 mientras que la HA recombinante los reduce en un 60% y 85% respectivamente.

Chabaudie y Boulard (1993) observaron que la inyección de la hipodermina C a bovinos no infestados e infestados previamente no modificaba significativamente la respuesta linfocitaria a diferentes mitógenos, así mismo tampoco influía negativamente en las respuestas celular y humoral específicas en los bovinos infestados.

Panadero y col. (2009), en un estudio *in vitro* para determinar el efecto inmunomodulador de los distintos antígenos de *Hypoderma lineatum*, comprobaron que la hipodermina A era el antígeno que más inhibía la respuesta linfoproliferativa, seguida por la hipodermina B, C y el extracto total. La hipodermina A produjo un descenso significativo en los niveles de la IL-10 y un incremento significativo del IFN-γ, mientras que el extracto total suprimió los niveles de todas las citoquinas estudiadas (IFN-γ, Il-10 e IL-4).

La existencia de resistencia cruzada entre las hipoderminas de *H. lineatum* e *H. bovis*, especialmente con la HC, lleva a pensar en la posibilidad de un producto vacunal polivalente. Pruett y col (1980) comprobaron una reactividad cruzada considerable entre ambas especies de *Hypoderma*, demostrando la existencia de epitopos compartidos, asociados en su mayor parte con la hipodermina C y A .

2.7.2.2.- RESPUESTA INMUNE HUMORAL

La acción de las L-1 provoca una respuesta humoral dirigida hacia sus secreciones que están constituidas esencialmente por los productos sintetizados por sus glándulas salivales (Boulard y col., 1970).

Durante la migración larvaria se aprecian importantes variaciones individuales en la respuesta humoral del hospedador, atribuibles a la muerte esporádica y más o menos lenta de las larvas; no obstante, en general la curva es ascendente y se repite en cada ciclo del parásito (Boulard, 1975).

Boulard y Weintraub (1973) estudiaron mediante hemoaglutinación pasiva la respuesta inmunológica en conejos infestados experimentalmente con L-1 de *H. bovis* e *H. lineatum*, poniendo en evidencia un aumento en los niveles de anticuerpos durante los 2 primeros meses postinfestación, con niveles máximos que se mantuvieron hasta el día 200 p.i.; observaron también que la capacidad de estimulación de la síntesis de anticuerpos por parte de los productos metabólicos de las larvas era mayor que la de los procedentes de las larvas muertas. Los primeros anticuerpos detectados estaban siempre dirigidos contra la fracción colagenasa de la larva.

La respuesta humoral del hospedador es diferente según se trate de una primoinfestación o de una reinfestación.

En una **primoinfestación** la reacción es más lenta; los anticuerpos circulantes empiezan a detectarse a los 60-90 días post-infestación (Robertson, 1980; Gingrich, 1982 y Baron y Weintraub, 1987a), lo que sugiere que la resistencia adquirida se desarrolla lentamente, o que es objeto de una inmunodepresión. Pruett y Barrett (1985) y Pruett y col. (1987) comienzan a detectar en el suero, IgG dirigidas contra los antígenos de las L-1 de *H. lineatum* a las 4-6 semanas postinfestación en ganado no infestado previamente.

Independientemente de la edad, los animales infestados por primera vez poseen una cinética de anticuerpos similar, aunque el título máximo de anticuerpos en los más jóvenes es significativamente más elevado que en los mayores (Robertson, 1980). Panadero (1996) y Morrondo (1998) comprobaron la ausencia de diferencias significativas respecto a la edad de los animales, mientras que el número de infestaciones previas de los animales influye considerablemente sobre la intensidad de la respuesta inmune.

En el caso de **reinfestaciones**, Colwell y Baron (1988, 1990) afirman que la respuesta anticuerpo comienza a detectarse a los 30 días postinfestación y se incrementa durante 3-4 semanas, coincidiendo con la migración de la larvas hacia el esófago y el canal espinal; durante su permanencia en los campamentos de invierno los niveles de anticuerpos descienden y permanecen relativamente bajos hasta que las larvas comiencen su migración hacia el dorso (25-28 semanas postinfestación). Los anticuerpos alcanzan el nivel máximo 1-2 semanas antes de la aparición del mayor número más elevado de nódulos en el dorso (37-43 sem. p.i.), debido a la liberación masiva de enzimas que lleva consigo la muda larvaria (Boulard, 1969); esta reacción es, sin embargo, de corta duración, se atenúa rápidamente y tiende a anularse una vez que todas las larvas han pasado al segundo y tercer estadio. En opinión de Pruett y col. (1987), este descenso del título de anticuerpos es especialmente importante en animales que sufren su primera infestación.

Sinclair y col. (1984), al estudiar la persistencia de los anticuerpos tras la infección con *H. bovis*, observaron que en ganado primoinfestado los anticuerpos comienzan a decrecer tras la aparición de las larvas en el dorso, siendo sus niveles negativos 14 semanas después de la desaparición de la infección; esto implica que la presencia de anticuerpos a finales del otoño e invierno se ha adquirido tras una nueva infestación. No encontraron una correlación entre el grado de infección y la persistencia de los anticuerpos. Colwell y Baron (1988, 1990) apuntan que solo los animales con bajas infestaciones (1-4 barros) cesan la producción de anticuerpos cuando se desprenden las últimas larvas, mientras que aquellos con cargas parasitarias mayores tienden a mostrar anticuerpos persistentes, incluso en algunos casos con animales que permanecen positivos durante más de un año.

Panadero y col. (2001) estudiaron el perfil de IgM e IgG así como las subclases IgG1 e IgG2 en bovinos infestados y tratados con ivermectina subcutánea. De esta forma en los animales control los perfiles de IgG permanecieron constantes durante la

infestación con un incremento durante la migración larvaria. En el caso de la subclase IgG2 este incremento sufrió se retrasó dos semanas, coincidiendo con la aparición de los nódulos larvarios en el dorso, lo que se correspondía con el mes de diciembre. Los niveles descendieron significativamente cuando las larvas 3 abandonaban el hospedador y al acercarse a los meses de mayo-junio, los niveles de estos anticuerpos volvían a incrementarse, probablemente coincidiendo con una nueva infestación. En cuanto a la IgM, los niveles apenas oscilaron a lo largo del ciclo del parasito. En los animales tratados con ivermectina, IgG y sus subclases mostraron un incremento significativo cuatro semanas después del tramiento y posteriormente mostraron un descenso significativo hasta las 12 semanas. En este grupo de animales, el nivel de anticuerpos también aumentaba al acercarse al final del estudio, coincidiendo con un ciclo nuevo del parásito.

Pruett y Temeyer (1989) demuestran la existencia de **anticuerpos calostrales** anti-hipoderma en vacas infestadas; los niveles son máximos el día del parto para disminuir rápidamente, de modo que a los 14 días representan solo el 4,2% con respecto a los existentes en el parto. La persistencia de los anticuerpos calostrales, así como de los séricos de vacas infestadas, es de unos 3-4 meses. A pesar de que los anticuerpos calostrales manifiestan actividad frente a todas las proteinas larvarias, la mortalidad larvaria en estos animales es muy baja, lo que indica que no poseen un claro efecto protector. La presencia de estos anticuerpos maternos puede retrasar la respuesta humoral y celular de los terneros ante una primoinfestación, de modo que no se observan anticuerpos hasta dos meses postinfestación. Martínez-Gómez y col. (1991) también detectaron la presencia de anticuerpos en terneros que no habían tenido ocasión de entrar en contacto con la mosca, sugiriendo la transmisión de anticuerpos anti-hipoderma vía calostral.

Doby y col. (1983) en humanos, observaron que a diferencia de lo que ocurre en helmintosis en las que el agente parasitario está en contacto temporal o permanente con los tejidos o la sangre del hospedador y provoca una elevación significativa de la tasa de IgE con respecto de los individuos sanos, en la hipodermosis este aumento no es tan importante y además no existe una relación entre la aparición de manifestaciones clínicas y el periodo de migración con los niveles de IgE.

Respecto a la respuesta inmunitaria después del tratamiento precoz frente a la hipodermosis, está demostrado que la destrucción de las larvas de *Hypoderma* conlleva la liberación del contenido enzimático de su intestino medio, lo que provocará

una reacción inmune más o menos rápida e intensa dependiendo del tipo de insecticida, de la dosis empleada y de la vía de administración (Panadero y col., 1997).

Boulard (1975), en bovinos tratados en otoño con dos insecticidas órganofosforados (fentión y niclofolán), comprobó que en el grupo tratado con fentión durante los tres días posteriores al tratamiento se produjo un rápido descenso en los niveles de anticuerpos, probablemente debido a que las proteínas antigénicas liberadas masivamente por las larvas se unen a los anticuerpos circulantes, sustrayéndolos del plasma; esta disminución se acentúa en los dos meses siguientes al tratamiento y posteriormente se estabilizan manteniéndose en un nivel bajo hasta abril. En los animales tratados con niclofolán, no se apreció disminución en los títulos de anticuerpos hasta un mes después del tratamiento; el descenso fue lento y se prolongó hasta abril, periodo en que se producen las mudas larvarias en el dorso del hospedador.

Boulard (1979) demostró una estrecha relación entre las variaciones de los niveles de anticuerpos circulantes tras el tratamiento y las concentraciones de histamina en sangre tras la reacción inmune como consecuencia de la formación de los inmunocomplejos. No obstante, observó que, la histamina tenía un papel poco importante en la mediación de los procesos anafilácticos.

En opinión de Francart (1978), la cinética de los anticuerpos también depende de los niveles de éstos en el inicio y/o de la carga parasitaria, de modo que cuando los títulos de anticuerpos eran elevados, el descenso era más rápido (aproximadamente 1 mes); por el contrario, si al principio el nivel de anticuerpos era bajo, éste permanecía estable durante unos dos meses; mientras que si los títulos iniciales eran muy bajos, se producía un aumento. Para Francart (op. cit.), los complejos antígeno-anticuerpo que se forman tras un tratamiento temprano de la hipodermosis, están relacionados con el descenso de la respuesta anticuerpo producida en animales muy infestados y tratados con órganofosforados. Estos complejos también están implicados en la reactivación de la producción de anticuerpos, que será mayor si se forman en presencia de una pequeña cantidad de antígenos. Además, este autor señala que la respuesta humoral posterior al tratamiento depende de la pauta de éste, de modo que una sola aplicación en un animal poco parasitado provoca los mismos efectos que un tratamiento fraccionado sobre un bovino intensamente parasitado.

Boulard (1984), en animales a los que se había administrado triclorfón, detectó variaciones en los niveles de anticuerpos entre las 2 y las 4 horas p.t. Asimismo, comprobó que, en animales a los que se había administrado oral y tópicamente distintas dosis del piretroide decametrin, la cinética de los anticuerpos circulantes variaban en función de la dosis y de la vía de administración.

Como ya se ha señalado anteriormente, la evolución de los anticuerpos es distinta según la composición del antiparasitario empleado. Así, tras la administración de órganofosforados los anticuerpos circulantes disminuyen en las horas y días posteriores al tratamiento, mientras que después de la administración de ivermectina el descenso de los títulos de anticuerpos se observa una semana después.

Prieto y col. (1990) detectaron, 5 meses después del tratamiento con 0,2 mg/Kg p.v. de ivermectina, una disminución en los títulos de anticuerpos, hasta llegar a niveles próximos a la negatividad; por el contrario, los animales infestados y no tratados tenían absorbancias elevadas. Sin embargo, 7 meses después del tratamiento, los niveles de anticuerpos de ambos grupos (tratados y no tratados) eran prácticamente negativos.

Panadero y col. (1997), en bovinos infestados naturalmente por *H*. *lineatum* e *H. bovis* determinaron el efecto sobre la cinética de anticuerpos, tras un tratamiento precoz con ivermectina y doramectina (0,2 mg/kg p.v. para ambas) observaron que los niveles de anticuerpos comenzaron a descender 1 mes post-tratamiento en el grupo tratado con ivermectina, mientras que en el de la doramectina, descendían 2 semanas más tarde. No obstante, en ambos grupos, el descenso fue muy significativo a las 21 semanas post-tratamiento, aunque posteriormente disminuyeron lentamente, pues todavía persistían en la semana 28 post-tratamiento. Además, en la semana 12 p.t. los animales tratados mostraban títulos bajos de anticuerpos debido a la eliminación de las larvas muertas, mientras que en los testigos estaban elevados pues se produjo en esa época la llegada de las larvas al dorso de los animales.

Lonneux y Losson (1994) en bovinos tratados con moxidectina tópica al 0,5%, comprobaron que los títulos de anticuerpos comenzaban a decaer al mes del tratamiento. Al comparar los niveles de anticuerpos de los animales tratados y de los testigos, observaron que las diferencias entre los dos grupos se incrementaban a partir del día 27 p.t.

Boulard y col. (1998) evaluaron la actividad de la moxidectina al 1% (0,2 mg/kg p.v.) en solución inyectable frente a las L-1 en terneros infectados de forma natural. Los niveles de anticuerpos mostraron una evolución paralela en el grupo de los tratados y de los testigos después de 1 mes post-tratamiento; posteriormente, observaron que descendían progresivamente durante 8 semanas en los primeros; mientras que en los testigos se mantuvieron estables. La cinética de anticuerpos fue similar a la observada por Lonneux y Losson (1994) con moxidectina tópica y sugiere la existencia de una acción progresiva de estos fármacos, pues el descenso de los títulos de anticuerpos se produjo gradualmente, posiblemente debido a la lenta liberación de los antígenos larvarios; de esta forma se reduciría la posibilidad de efectos secundarios ante un tratamiento tardío realizado en otoño.

Finalmente, Colwell y col. (1997) examinaron el efecto del tratamiento con distintas avermectinas y milbemicinas sobre los niveles y persistencia de anticuerpos anti-*Hypoderma*; concluyeron que las encuestas serológicas realizadas en otoño no deberían verse influidas por un tratamiento a base de avermectinas/milbemicinas, pues los anticuerpos se detectan al menos durante 6 semanas p.t. Por otra parte, la administración de un tratamiento precoz podría interferir en el desarrollo de resistencia frente a futuras infestaciones, al interrumpirse el estímulo antigénico.

2.8.- LAS CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS INFECCCIONES PARASITARIAS

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas en respuesta a un estímulo inmune. Su secreción es un acontecimiento breve y autolimitado y normalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, aunque en ciertos casos pueden incrementarse notablemente los niveles en respuesta a determinadas agresiones. De igual forma que otros compuestos peptídicos, las citoquinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, lo que explica que se necesiten cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico (Abbas y col., 2002). Es también muy habitual que la misma citoquina tenga diversas acciones al actuar sobre diferentes células (pleiotropismo), así como que se den acciones redundantes entre diferentes citoquinas, sobre todo *in vitro*. El pleiotropismo puede explicarse por la existencia de receptores para una misma citoquina en diferentes tipos de celulares y/o por la existencia de diferentes cascadas de señalización intracelular. La redundancia se puede justificar, por lo menos en parte, por la existencia de receptores o vías de señalización compartidos por diferentes citoquinas (Ozaki y Leonard, 2002). Por último, como consecuencia de toda esta variedad en la señalización, es muy habitual encontrar casos de antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos) o sinergismo (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente) entre diferentes citoquinas.

La células Th (células T "helper") evolucionan en dos subpoblaciones: las células Th1 están vinculadas con los procesos inflamatorios, la activación de macrófagos y la sensibilidad retardada, elaboran IL-2 e IL-3, interferón gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral (TNF), GM-CSF y linfotoxina. Las células Th2 ayudan a las células B a sintetizar anticuerpos y secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, TNF y GM-CSF. La IL-10 es secretada por ambas subpoblaciones en humanos. Se sabe que la interacción temprana del antígeno con los macrófagos o células dendríticas que producen IL-12 o con las que secretan IL-4 desvía la respuesta hacia Th1 o Th2, respectivamente. Estos conceptos han llevado a la expresión paradigma Th1/Th2 bipolar. Las Th1 son eficaces contra infecciones intracelulares virales y microorganismos que crecen en macrófagos, mientras que las Th2 son buenas colaboradoras de las células B y parecieran estar adaptadas para la defensa contra los parásitos que son vulnerables a IgE. No obstante, el paradigma Th1/Th2 postulado por Mosmann y col. (1986) en un modelo murino no está tan bien definido en el ganado

vacuno, en el que la mayor parte de los estudios indican una respuesta mixta o Th0 (Estes and Brown, 2002). Por otra parte, tal vez sea mejor no estar tan rígidamente limitado por el paradigma Th1/Th2 puesto que la polarización de la respuesta inmune es un proceso dinámico que puede variar a lo largo de las distintas fases de desarrollo del parasito en el hospedador.

La **interleuquina 12** (IL-12) se definió originalmente como un activador de la función citolítica de las células NK producido por los macrófagos, aunque actualmente se sabe que es un potente inductor de la producción de IFN-γ, tanto por las células T como por las células NK. La IL-12 actúa como un factor de diferenciación para las células T CD4, favoreciendo su especialización en células tipo Th 1 productoras de IFN-γ, que ayudan en la inmunidad mediada por los fagocitos. Esta interleuquina aumenta la función citolítica de las células NK activadas y las células T CD8. Al mismo tiempo, la IL-12 proporciona una importante conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, favoreciendo el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas que pueden proteger mejor al hospedador frente a agentes extraños (Abbas y col., 2002).

La **interleuquina-10** (IL-10) es una citoquina producida por macrófagos activados, algunos linfocitos y algunos otros tipos celulares no linfocitarios (queratinocitos). Las dos principales actividades de la IL-10 son inhibir la producción de citoquinas (TNF, IL-1 e IL-2) por los macrófagos y las funciones accesorias de estos en la activación de las células T. La IL-10 en el macrófago da lugar a una disminución de la expresión del CMH II, reduce la endocitosis e inhibe la producción de las citoquinas proinflamatorias y la generación de NO. El efecto más claro de estas acciones es inhibir la respuesta inmunitaria innata y la específica mediada por células T (Mosmann, 1994)

La **interleuquina 4** (IL-4) se identificó inicialmente como una citoquina producida por las células T colaboradoras que estimulaba la proliferación de las células B, así como la expresión de las moléculas MHC de tipo II. Actualmente se sabe que la función fisiológica principal de la IL-4 es regular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y mastocitos/eosinófilos. La IgE es la mediadora fundamental de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y se cree que el aumento de la concentración de IL-4 es favorable para el desarrollo de alergias. Los anticuerpos IgE desempeñan también un papel importante en la defensa frente a las infecciones por artrópodos y helmintos.

Las principales fuentes celulares de IL-4 son los linfocitos T CD4, específicamente la subpoblación Th2. La IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación para las células T, en particular para las células de la subpoblación Th2, es decir, favorece el desarrollo de las células Th2 a partir de las células T vírgenes estimuladas por el antígeno; asimismo, funciona como un factor de crecimiento autocrino para las células Th2 diferenciadas, favoreciendo posteriormente la expansión de esta subpoblación. Los mastocitos y basófilos activados, al igual que algunas células T CD8, son capaces igualmente de producir IL-4. La IL-4 tiene importantes acciones sobre varios tipos celulares; se requiere para la producción de IgE y es la principal citoquina estimuladora del cambio de las células B a este isotipo (Abbas y col., 2002).

Asimismo, regula la expresión y secreción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α e IFN-γ lo que inhibe la respuesta Th1.

El **interferón-γ** (IFN-γ), también llamado interferón tipo II o inmunitario es producido por las células T CD4 y CD8 activadas y por las células NK. El inicio de la transcripción es consecuencia de la activación por el antígeno y aumenta por la acción de la IL-2 y la IL-12. Es un potente activador de los fagotitos mononucleares, es el principal factor activador de macrófagos y proporciona el mecanismo a través del cual las células T activan a los macrófagos. Aumenta la expresión de moléculas MHC de tipo I y de tipo II en una gran variedad de tipos celulares. De esta manera, amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria favoreciendo la activación de las células T CD4 colaboradoras. Actúa sobre los linfocitos T favoreciendo su diferenciación desde células T CD4 vírgenes hacia la subpoblación Th1 e inhibe la proliferación de las células Th2. No obstante, es una citoquina necesaria para la maduración de los CD8. En los ratones, se comprobó que actúa sobre las células B favoreciendo el cambio a las subclases IgG2a e IgG3 y la inhibición del cambio a IgG1 e IgE. De esta forma el IFN-γ induce respuestas de anticuerpos que también participan en la eliminación de agentes extraños. Activa los neutrófilos aumentando su metabolismo oxidativo y estimula la actividad citolítica de las células NK. Es un activador de las células endoteliales vasculares, favoreciendo la adhesión de los linfocitos T CD4 y las alteraciones morfológicas que facilitan la extravasación de estos. El IFN-γ también potencia muchas de las acciones del TNF-α sobre las células endoteliales. Finalmente, bloquea los efectos proliferativos de la IL-4 sobre las células Th2, previniendo la expresión de esta subpoblación de células T (Suk y col., 1993). El efecto directo de estas diferentes actividades es favorecer reacciones inflamatorias

ricas en macrófagos, mientras que inhiben reacciones ricas en eosinófilos dependientes de IgE.

El **factor de necrosis tumoral-α** (TNF-α) es el mediador principal de la respuesta frente a las bacterias gram-negativas y también puede desempeñar un importante papel en otras respuestas inmunitarias. La principal fuente celular del TNF-α son los fagocitos mononucleares activados por el lipopolisacárido de bacterias gram-negativas, aunque también puede ser secretado por las células T estimuladas por el antígeno, células NK y mastocitos activados. El IFN-γ, producido por las células T, aumenta la síntesis de TNF-α por los fagocitos mononucleares estimulados por el antígeno. De esta manera, el TNF-α actúa como mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, y es un importante nexo de unión entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda. Entre sus acciones destacan las siguientes: el TNF-α hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie que hacen que los leucocitos se adhieran a la superficie de la célula endotelial, inicialmente los neutrófilos, y posteriormente, los monocitos y linfocitos. Estas acciones contribuyen a la acumulación de leucocitos en los focos inflamatorios y son probablemente los efectos locales fisiológicamente más importantes. Estimula a los fagocitos mononucleares y otros tipos celulares a la secreción de citoquinas que contribuyen al reclutamiento de leucocitos. Activa a los leucocitos inflamatorios para que destruyan agentes extraños. El TNF-α es especialmente potente para activar los neutrófilos, pero también afecta a eosinófilos y fagocitos mononucleares. La producción crónica de concentraciones bajas de TNF-α da lugar a la regeneración tisular. Esta citoquina actúa como un factor de angiogénesis, induciendo la formación de nuevos vasos, así como un factor de crecimiento para los fibroblastos, induciendo el depósito de tejido conectivo. Estos efectos del TNF-α son críticos para las respuestas inflamatorias locales contra los agentes extraños. Si hay bajas concentraciones de esta citoquina, por ejemplo en animales tratados con anticuerpos neutralizantes anti-TNF o en los ratones con inhibición genética de TNF-α, la consecuencia puede ser un fallo defensivo ante infecciones (Fong y Mosmann, 1990).

Son numerosos los trabajos que estudian el papel de las interleuquinas en el desarrollo de distintas parasitosis.

Aunque en la leishmaniosis cutánea por *L. major* el papel de las subpoblaciones Th1 como protectora y Th2 como promotora de enfermedad está

suficientemente demostrado (Liew y O´Donell, 1993; Belkaid y col., 2000) en la infección por *L. donovani* (leishmaniosis visceral) esta relación no está tan claramente establecida (Kaye y col., 1991; Murray y col., 1992), comprobándose que hay otras subpoblaciones de células T implicadas en el proceso (Liew y O´Donnell, 1993), tales como los linfocitos T citotóxicos (CD8). Las células T citotóxicas producen IFN-γ y TNF-α importantes en la activación de los macrófagos para la destrucción de *Leishmania* (Liew y Dhaliwal, 1987; Liew y col., 1990).

Alves y col. (2008) observaron que la carga parasitaria en los ganglios linfáticos se multiplicaba por dos en los animales con síntomas; sin embargo, los animales asintomáticos presentaban el mayor nivel de IFN-γ y de TNF-α, lo cual indicaba que estas dos citoquinas desempeñaban un papel importante en la protección contra la infección. Por el contrario, la expresión de la IL-10 fue superior en los animales que manifestaban síntomas clínicos.

Con respecto a los protozoos hemáticos, Goff y col. (2003) demostraron la importancia del IFN-γ en la respuesta Th1 durante la infección por *Babesia bovis* en terneros y comprobaron que el óxido nítrico secretado por los monocitos bovinos expuestos a merozoitos de *B. bovis* poseía un efecto babesicida. Del mismo modo, Zintl y col. (2005) también observaron que las infecciones por *Babesia bovis* parecen estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN-γ y TNF-α. De la misma forma, observaron en terneros infectados con este parásito una respuesta temprana caracterizada por la secreción de IL-12 e IFN-γ en las células esplénicas. Posteriormente, estos animales ya no mostraban una reacción tipo Th1 y aparecían niveles de IL-10 que se mantenían durante un periodo prolongado de tiempo.

En cuanto a *Plasmodium* spp., Patterson y col. (1999) comprobaron que una respuesta prolongada del IFN-γ se asociaba a un aumento de la supervivencia de los ratones infectados.

La neosporosis es una protozoosis en la que el IFN-γ juega un papel importante; así, Shibahara y col. (1999) observaron un aumento en el nivel de IFN-γ en ratas infectadas con *Neospora caninum.* Más tarde, Long y Baszler (2000) observaron que niveles bajos de IL-4 y niveles más altos de IFN-γ se relacionaban con una disminución en la transmisión vertical del parásito. Teixeira y col. (2005) observaron en ratones inoculados con taquizoitos de *Neospora caninum* una respuesta Th1

importante, con niveles elevados de IFN-γ a los 7 y 15 días post-infección. No obstante, Rosbottom y col. (2007) demostraron que en esta parasitación existe una participación de las dos respuestas Th1 y Th2.

López-Gatius y col. (2007) comprobaron que el riesgo de aborto era 15,6 veces más alto en aquellas vacas que expresaban un nivel reducido de IFN-γ, de modo que la producción de esta citoquina se vincula con la protección del aborto de los animales infectados.

En cuanto a la infección por *Toxoplasma*, Thouvenin y col. (1997) demostraron en cultivos de células esplénicas de ratas gestantes e infectadas con *T. gondii* que el nivel de IFN-γ y óxido nítrico era elevado con respecto a ratas no gestantes, mientras que la respuesta Th2 era menor. Del mismo modo, Abou-Bacar y col. (2004) apreciaron que la inmunidad protectora en ratones infectados con *T. gondii* estaba mediada principalmente por citoquinas secretadas en la respuesta Th1 y, de forma especial, por el IFN-γ. Rozenfield y col. (2005) observaron que el IFN-γ era la principal citoquina implicada en la defensa inmunológica frente a este parásito.

En un estudio en cerdos infectados por *Toxoplasma gondii,* Dawson y col. (2005) demostraron por PCR que predominaba un patrón de liberación de citoquinas de tipo Th1, mientras que infectando posteriormente estos cerdos con *Ascaris suum* veían que este patrón se transformaba a Th2. En ratones con una deficiencia genética de IFN-γ, Feng y col. (2008) demostraron una menor resistencia a la infección por *Toxoplasma*.

Recientemente, Flores y col. (2008) analizaron el papel que desempeñaba el factor inhibidor de la migración de macrófagos utilizando ratones modificados genéticamente que presentaban ausencia de este factor. Estos ratones tenían lesiones más intensas, mayor número de quistes en el cerebro y niveles de citoquinas menores a nivel hepático. Las células dendríticas de estos animales, produjeron niveles menores de IL-1β, IL-12 y TNF-α después de ser estimuladas con el antígeno de este protozoo.

En general, se ha visto que las infecciones intestinales con helmintos dirigen la respuesta inmune hacia un perfil de citoquinas de tipo 2, que conlleva la producción de IgE, activación de mastocitos y secreción de mucus que contribuyen a la eliminación del parásito (Grencis, 1997).

Helmby y Grencis (2003) en ratones infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* observaron que la expulsión de adultos del intestino se asociaba con una mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th 2 que se manifiesta con una abundante secreción de las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13. De esta manera la respuesta Th 2 es responsable de la inmunidad protectora para muchos nematodos intestinales, incluyendo a *T. spiralis*. También concluyeron que la IL-12 regula la proliferación de los mastocitos, independientemente del IFN-γ. De forma similar, Scales y col. (2007), en una infección experimental con *Triquinella spiralis* en ratas, comprobaron que la respuesta Th2 tenía un papel muy importante y en concreto observaron una producción elevada de IL-4 e IL-13, de modo que la carencia de esta última citoquina daba lugar a una enteropatía más intensa en estos ratones.

Johnson y col. (2005) observaron en el curso de una infección primaria por *Dictyocaulus viviparus* un perfil mixto de citoquinas que lleva a la eliminación de los parásitos en aproximadamente un mes, lo que coincide con otros trabajos en los cuales se pone en duda la necesidad de la polarizacion de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 para la protección del ganado vacuno frente a los nematodos.

Por lo que respecta a *Toxocara canis,* Torina y col. (2005) observaron que la concentración de IL-10 aumentaba durante la gestación mientras que la concentración de IFN-γ disminuía. Tras el parto, en los cachorros, la concentración de IL-10 disminuía con la edad mientras que la de IFN-γ aumentaba. Pecinali y col. (2005) establecieron una estrecha correlación entre las lesiones tisulares causadas por la migración larvaria de *Toxocara canis* en ratones infectados experimentalmente y el incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y las que tienen un efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos.

En lo que respecta a las trematodosis, Poitou y col. (1993) observaron que durante la infección por *Fasciola hepatica* tenía lugar una respuesta linfocitaria Th1, que era reemplazada por otra Th2 que parece más orientada hacia un mecanismo de tolerancia por parte del hospedador que a un fenómeno de protección y eliminación de la infección. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que se pueden producir respuestas “intermedias”, y aparecer clones de linfocitos Th1, Th2 y Th0 (producen IL-2, IL-4 e IFN-γ). Clery y col. (1996) comprobaron en terneros con fasciolosis crónica natural y en terneros reinfectados experimentalmente que no se detectaba IFN-γ y concluyeron que, puesto que la infección se había establecido con éxito, se trataba de una respuesta linfocitaria no protectora de tipo Th2. Además, Poitou y col. (1993) y

Clery y col. (1996) señalaron que en el caso de fasciolosis crónicas, el hospedador limita su respuesta inmune con objeto de reducir las lesiones tisulares y limitar la extensión de la infección mediante una respuesta de tipo Th2.

Gironés y col. (2007), en una infección experimental con *Fasciola hepatica* en ratas, comprobaron que en la semana 7, 10 y 20 había un predominio de las citoquinas Th2 con respecto a las citoquinas de tipo Th1. Estos autores no detectaron diferencia significativa en la secreción de IFN-γ y TNF-α comparando con las ratas sin infectar; sin embargo, los niveles de IL-1, IL-10 e IL-4 a las 7 semanas después de la infección eran más altos en las ratas parasitadas que en las testigo. Posteriormente, a las 10 y 20 semanas observaron una disminución de la IL-10 e IL-4 y en la semana 20 no encontraron ninguna diferencia en la secreción de las diferentes interleuquinas estudiadas. Tampoco encontraron correlación entre el número de adultos en hígado y la producción de citoquinas a lo largo del estudio. No obstante, observaron una correlación negativa significativa entre el nivel de IL-4 y la eliminación de huevos a las 7 y 10 semanas post-infección.

Chevillard y col. (2003) comprobaron que la producción de productos de excreción-secreción por *Schistosoma mansoni* estaba regulado por diferentes citoquinas, entre las cuales estaba el IFN-γ. También vieron que niveles altos de IFN-γ se relacionaban con una reducción notable del riesgo de fibrosis hepática. Por otra parte la cinética del IFN-γ y de la IL-10 mostraba que la respuesta protectora se regulaba por las citoquinas tipo Th1 en fases tempranas de la infección. Sher y col. (1992) afirman que la IL-10 e IFN-γ juegan un papel fundamental en el inicio de la infección por *Schistosoma* y posteriormente se sustituye por una respuesta no protectora de tipo Th2.

Boros y Whitfield (1998) estudiaron la formación del granuloma inflamatorio en ratones infectados por *Schistosoma mansoni,* demostrando que la IL-10 era un potente regulador de la respuesta inflamatoria que promueve la formación del granuloma.

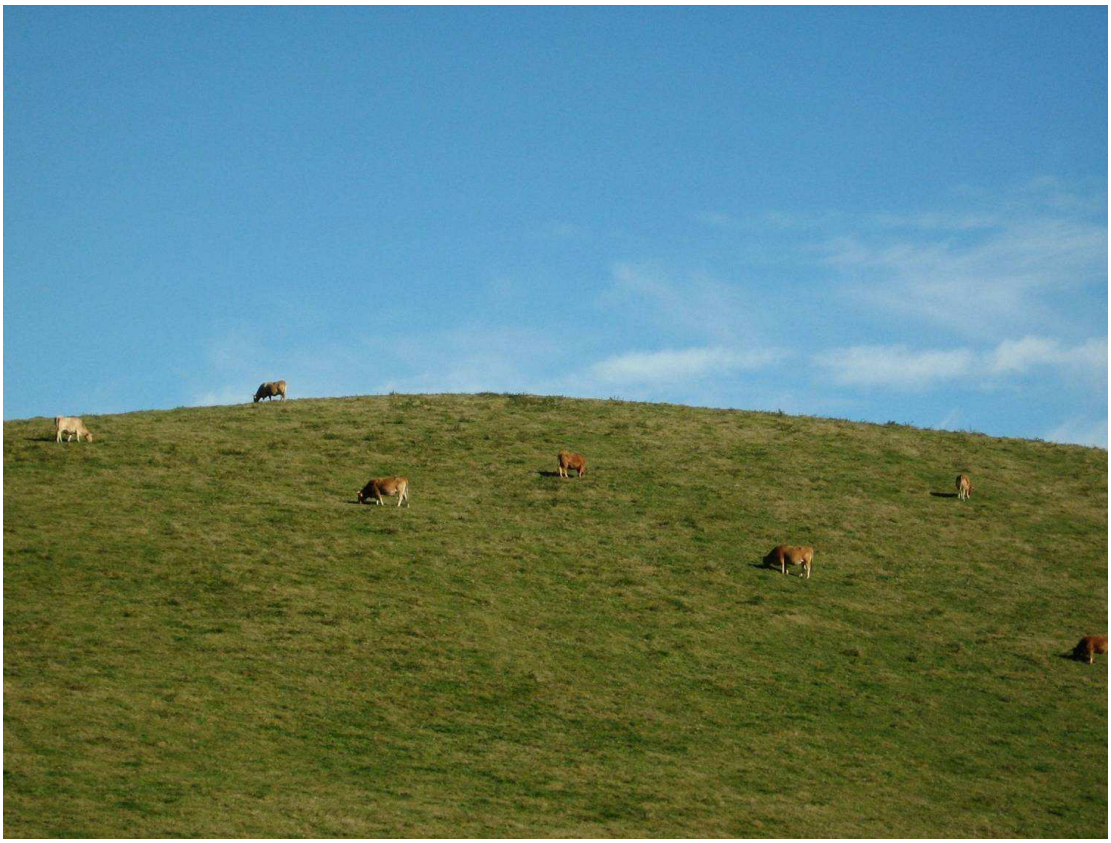
En relación con las parasitosis por artrópodos, son escasos los trabajos realizados, y gran parte de ellos hacen referencia a la infestación por garrapatas. Los estudios han demostrado que las secreciones salivales inoculadas por las garrapatas produce un aumento de las citoquinas Th2, al tiempo que inhibe las asociadas a una respuesta de tipo Th1 (Ferreira y Silva, 1998; Kovář, y col., 2002). Kopecky y col. (1999) evaluaron el efecto de un componente antigénico de la saliva de *Ixodes ricinus*

(SGE) sobre la secreción de IFN-γ e IL-10, comprobando que el SGE inyectado a ratones disminuía notablemente la secreción de IFN-γ en cultivos de células de bazo, pero aumentaba la secreción de IL-10 lo que podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de las secreciones salivales de la garrapata.

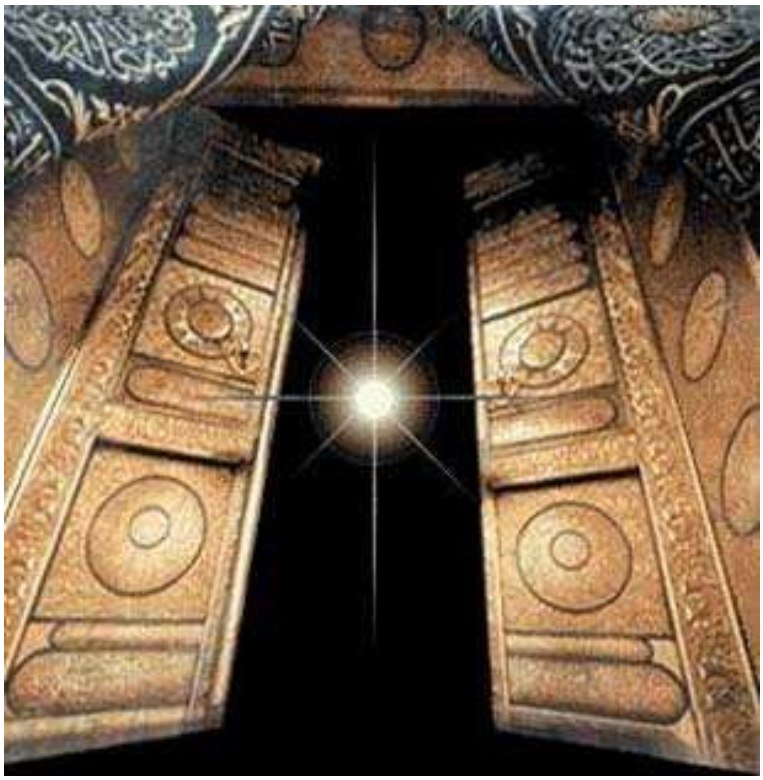
Ferreira y Silva (1998), en un estudio en ratones para comprobar el efecto de las diferentes citoquinas en la infestación por garrapatas en ratones, comprobaron que las células linfáticas cultivadas en presencia del mitógeno Con A expresaban un perfil Th2, representado por la secreción aumentada de IL-4 e IL-10. Por el contrario, la IL-2, el IFN-γ y la IL-12 se inhibían de forma significativa. Estos hallazgos indican que las señales de las secreciones salivales de las garrapatas podrían modular la respuesta inmunitaria del hospedador hacia una respuesta tipo 2. En ganado vacuno, Ramachandra y Wikel (1995) demostraron que los extractos salivales de *Dermacentor andersoni* inhiben la síntesis de IL-1, IL-2, IFN-γ y TNF-α por los macrófagos bovinos. Hay que destacar que en las infestaciones por garrapatas la IL-10 interfiere en la maduración funcional de las células dendríticas (De Smedt y col., 1997). En los ganglios linfáticos de ratones parasitados por garrapatas, D' Andrea y col. (1993) observaron una reducción de la IL-12 debida probablemente a una producción elevada de IL-10 y de IL-4. De esta forma la IL-10 junto con la IL-4 suprimiría la síntesis de la IL-12.

En la miasis provocada por *Lucilia sericata,* Elhay y col. (1994) detectaron a nivel dérmico un aumento de la expresión de las citoquinas IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-2 e IFN-γ junto con una intensa infiltración de granulocitos, células T y macrófagos. Por otra parte, el papel de la respuesta inmune para determinar la resistencia o receptividad a la infección por *Lucilia* se considera de vital importancia en la selección de animales genéticamente resistentes. Así mismo, observaron que los niveles de IFN-γ aumentaron levemente en los animales primoinfestados a las 100 h.p.i, mientras que en infecciones secundarias todas las ovejas demostraron mayor aumento de la respuesta del IFN-y con niveles elevados a las 72 horas. En cuanto a la expresión de las citoquinas a nivel dérmico, las IL-6 y 8 aumentaban rápidamente, a las 6 horas post-infestación manteniéndose durante las siguientes 48 horas, pero no observaron este aumento en el caso del TNF-α. Otras citoquinas como la IL-2, IFN-γ e IL-10 también se detectaron a las 6 horas post-infestación, no obstante el IFN-γ no se demostró en todos los animales. Cabe destacar la ausencia de IL-4 en todos los animales. Bowles y col. (1994) encontraron un aumento en el nivel de IFN-γ y IL-2 tras la primoinfección por *Lucilia cuprina*, siendo más elevado en las ovejas reinfestadas.

Con respecto a la hipodermosis, Panadero y col. (2009) estudiaron el efecto *in vitro* de las distintas fracciones antigénicas de *Hypoderma* sobre la secreción de distintas citoquinas; comprobaron que la hipodermina A aumentaba la secreción de IFN-γ y una suprimía de la IL-10, lo que indicaría una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, el antigeno somático total induce una supresion de la producción de IFN-γ, IL-10 e IL-4. Estos autores demostraron que cada una de las tres hipoderminas secretadas por las L-1 de *Hypoderma* poseen efecto inmunomodulador individual pero que también se solapa parcialmente.



ENSAYO 1: RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA EN MUESTRAS INCLUIDAS EN PARAFINA DE GANADO VACUNO INFESTADO EXPERIMENTALMENTE POR *Hypoderma lineatum*



3.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La infestación por *Hypoderma* sp. tiene lugar mediante la penetración activa de las larvas 1 a través de la piel del hospedador. Una vez que se finaliza la entrada, en aproximadamente 6 horas, las larvas comienzan su migración por el tejido subcutáneo que las llevará hasta la submucosa esofágica (*Hypoderma lineatum*) y la grasa epidural (*H. bovis*). De acuerdo con diversos autores (Nelson y Weintraub, 1972; Gingrich, 1980 y Colwell y col., 2008), la piel constituye la principal barrera a la invasión larvaria, como lo demuestra el hecho de que, en infestaciones experimentales en las que las larvas no atraviesan activamente la piel sino que se inyectan subcutáneamente, no se llega a desarrollar inmunidad protectora frente a otras infestaciones posteriores.

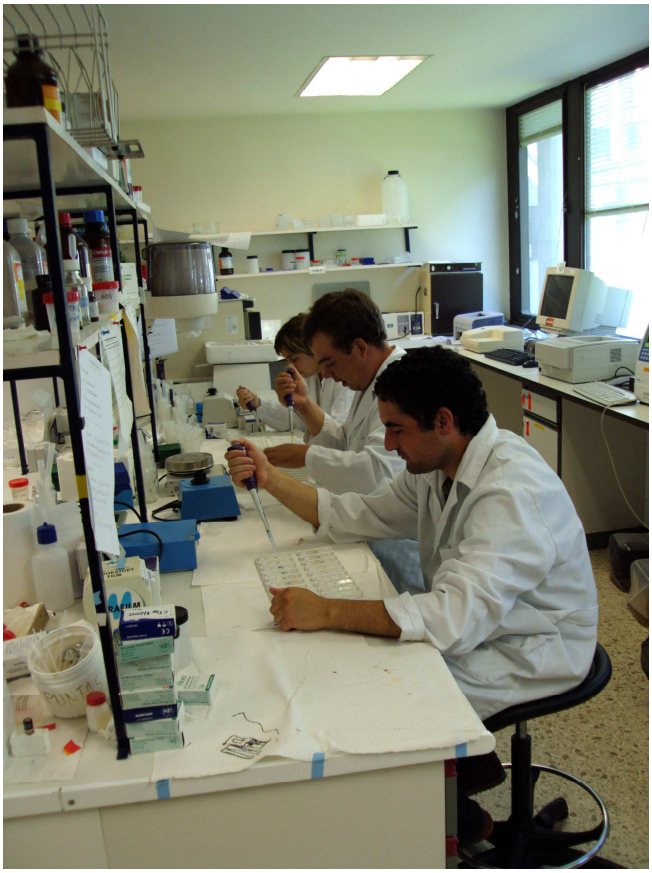
En este ensayo nos propusimos estudiar, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, la respuesta celular local durante la fase de penetración larvaria, utilizando muestras de piel incluidas en parafina, y para ello nos planteamos los siguientes **objetivos específicos:**

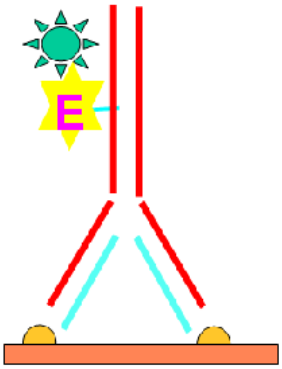
A) Examinar los cambios histopatológicos que tienen lugar en el tejido cutáneo del ganado vacuno infestado por *H. lineatum*, durante las fases iniciales de infestación (96 h), prestando especial atención a la respuesta eosinofílica.

B) Estudiar la respuesta de distintas poblaciones celulares en el infiltrado inflamatorio cutáneo en ganado vacuno infestado por *H. lineatum*, durante la fase de penetración larvaria.

C) Determinar la distribución de los infiltrados inflamatorios y células positivas en los distintos estratos de la piel (epidermis, dermis superficial, profunda e hipodermis).

D) Establecer diferencias entre la respuesta celular en animales primo y reinfestados por primera vez y su papel regulador en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a *Hypoderma* spp.





3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.- ANIMALES E INFESTACIONES EXPERIMENTALES

En la realización del presente estudio, se emplearon 12 vacas de raza Holstein, que se distribuyeron en 3 grupos:

- El primer grupo (G-1) estaba formado por 4 novillas que se mantuvieron como testigos sin infestar.

- El segundo grupo (G-2), integrado por 4 novillas que se infestaron experimentalmente, actuó como grupo primoinfestado.

- El tercer grupo (G-3), formado por vacas que ya habían sido infestadas el año anterior, constituyó el grupo reinfectado por primera vez.

Todos los animales estaban libres de otros parásitos, tal como indicaron los análisis coprológicos y serológicos de rutina, y tampoco presentaban ningún signo clínico que pudiera indicar otras enfermedades.

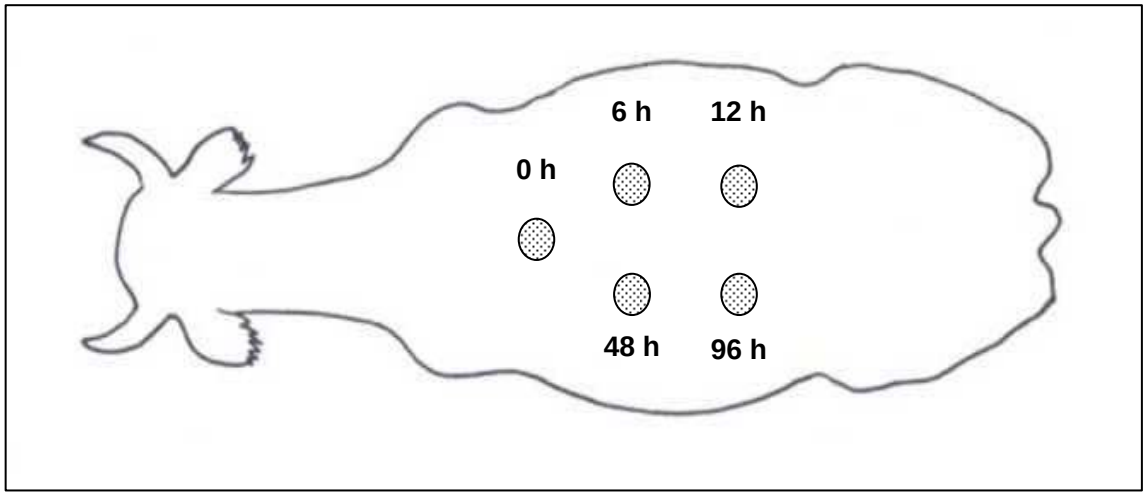
La infestación de los grupos 2 y 3, primo y reinfestado, se realizó con larvas 1 de *Hypoderma lineatum* obtenidas de acuerdo con el protocolo establecido por Colwell (2001). En primer lugar, se recogieron larvas 3 de *H. lineatum* en el momento de abandonar el dorso de vacas parasitadas. Posteriormente, se pusieron a pupar en condiciones controladas alternando temperaturas de 15ºC y 23ºC durante 6 y 18 horas, respectivamente y con una humedad relativa (HR) del 75%. Después de eclosionar las moscas, y tras la cópula, se indujo la oviposición de las hembras colocándolas sobre trozos de piel bovina de 9x9cm mantenidos a una temperatura de 33ºC. A continuación, se desprendieron los huevos de los pelos y se cultivaron a una temperatura de 33ºC, con una HR del 75%. Finalmente, las L-1 recién eclosionadas se mantuvieron hasta el momento de la infestación en un medio salino al 0,85% a 10ºC.

Una vez obtenidas todas las larvas necesarias para el estudio, se infestaron los animales de los grupos 2 y 3 con 50 L-1 recién eclosionadas colocando 10 larvas en 5 puntos de la piel del dorso (Esquema 1). Posteriormente, se observaron durante 10 horas para confirmar su penetración a través de la piel.

Durante la infestación y los siguientes 4 días, los animales se mantuvieron en el Centro de Investigaciones de Lethbridge (Alberta, Canadá), donde permanecieron

en cubículos individuales, sujetos por colleras para evitar el lamido o rascado, y con una temperatura de 15ºC y con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Al final del estudio (5º día postinfestación), todos los animales infestados se trataron con 0,5mg/k.p.v.de moxidectina “pour on” (Cydectin®, Ford Dodge Veterinaria) para liberarlos de la parasitación larvaria.



Esquema 1.1.- Distribución de los puntos en los que se llevó a cabo la infestación experimental y la toma de muestras.

3.2.2.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS DÉRMICAS

Las muestras se obtuvieron con agujas de biopsia de piel o sacabocados, con las cuales se extrajo un cilindro de piel de 6 mm de diámetro de cada uno de los 5 puntos de infestación a las 0, 6, 12, 48 y 96 horas postinfestación (Esquema 1.1).

Foto 1. Anestesia de la zona

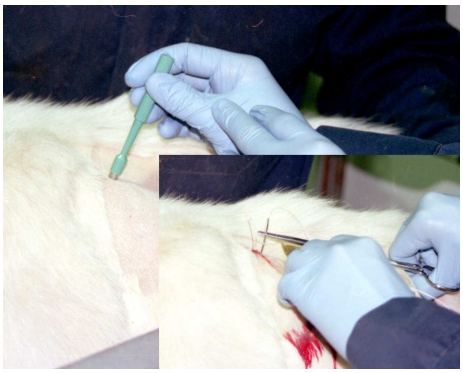


Foto 2. Toma de muestras y sutura

Antes de realizar la biopsia se anestesió la zona con una infiltración local de lidocaína (Foto 1), y una vez tomada la muestra se cerró el área con varios puntos de sutura (Foto 2).

De las vacas del grupo testigo (G-1), se recogieron también muestras de piel de las mismas zonas y siguiendo el mismo esquema anterior.

A continuación, cada muestra se dividió en dos partes simétricas, fijando una de las mitades en paraformaldehido al 2% para su empleo en el estudio histopatológico y la otra en etanol al 95% para realizar el estudio inmunohistoquímico.

3.2.3.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El material y los reactivos utilizados para el procesado de las muestras y tinciones histoquímicas se muestra a continuación:

Tabla 1.1.- Material y reactivos empleados para el estudio histopatológico

- Procesador automático de tejidos
- Consola montadora de bloques
- Estufa a 37ºC
- Microtomo (Microm HM 325)
- Cubeta de baño histológico
- Paraformaldehido tamponado 2% (Panreac Química, Barcelona, España)
- Etanol 50º, 70º, 96º y 100º (Panreac)
- Xilol puro (Panreac)
- Parafina con punto de fusión a 51-53ºC (Panreac)
- Hematoxilina de Harris (Panreac)
- Eosina (Panreac)
- Medio de montaje DPX® (Panreac)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

Para el estudio histopatológico, las muestras de piel se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 24 horas. Tras el tallado de las muestras, se introdujeron en un procesador automático de tejidos, donde fueron deshidratadas en gradientes crecientes de etanol siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

1) Lavado en agua corriente durante 1 hora y media para retirar el paraformaldehido
2) Etanol 50º durante 1 hora y media
3) Etanol 70º durante 1 hora y media
4) Etanol 96º I durante 1 hora y media
5) Etanol 96º II durante 1 hora y media
6) Etanol 100º I durante 1 hora y media

7) Etanol 100º II durante 1 hora y media

A continuación, las muestras se pasaron a xilol y se incluyeron finalmente en parafina líquida (51-53ºC).

Los cortes histológicos se realizaron con un microtomo con 4 µm de grosor y seguidamente se pasaron a un baño histológico (37ºC) hasta que las muestras estuvieron completamente extendidas y se recogieron con un portaobjetos. Los cortes histológicos se dejaron secar en una estufa a 37ºC durante 24h, hasta que estuvieron completamente adheridos al portaobjetos.

La tinción elegida para realizar el estudio histológico fue la Hematoxilina-Eosina (H-E) siguiendo el protocolo descrito en la tabla 2.

El sellado de las muestras se realizó aplicando una gota de medio de montaje rápido (DPX®) sobre el cubreobjetos y colocando cuidadosamente sobre él, el portaobjetos con la muestra. Finalmente, se eliminaron las burbujas de aire que pudieran quedar y se dejaron secar los cortes durante 24h antes de examinarlas al microscopio.

El recuento celular se realizó a 200 y 400 aumentos. Debido a que las poblaciones celulares no se distribuyen de forma uniforme por todo el espesor de la piel, y con objeto de minimizar el error que se podría introducir al seleccionar áreas concretas, a la hora de valorar los infiltrados inflamatorios y realizar el recuento de los eosinófilos, se observó toda la superficie de la muestra. Esta superficie se procuró que fuera constante para todas las muestras (25,3±1,24 mm^2), por lo que los resultados se indicarán como número de células/muestra.

Tabla 1.2.- Técnica de tinción Hematoxilina-eosina

Desparafinado de las muestras

- Xilol I durante 10 minutos
- Xilol II durante 10 minutos

Hidratación de las muestras

- Etanol 100º I durante 5 minutos
- Etanol 100º II durante 5 minutos
- Etanol 96º I durante 5 minutos
- Etanol 96º II durante 5 minutos
- Etanol 70º durante 5 minutos
- Etanol 50º durante 5 minutos

Varios lavados con agua corriente

Tinción de las muestras

- Hematoxilina durante 5 minutos

Varios lavados con agua corriente

- Carbonato de litio durante 10 segundos

Contraste

- Eosina durante 3 minutos

Varios lavados con agua corriente

Deshidratación de las muestras

- Etanol 50º durante 1 minuto
- Etanol 70º durante 1 minuto
- Etanol 96º I durante 1 minuto
- Etanol 96º II durante 1 minuto
- Etanol 100º I durante 3 minutos
- Etanol 100º II durante 3 minutos
- Xilol I durante 5 minutos
- Xilol II durante 5 minutos

3.2.4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El material y tampones utilizados en la toma, procesado de muestras y realización de cortes histológicos se señalan en la tabla 1.3.

Tabla 1.3.- Material utilizado para el estudio inmunohistoquímico

A.- Toma de muestras y realización de cortes histológicos

- Procesador histológico
- Dispensador de parafina
- Microtomo (Microm HM 325)
- Poli-L-lisina al 10% (Sigma-Aldrich)
- Etanol 50º, 70º, 96º y 100º

B.- Soluciones tampón

B.1.- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7,2

- 1000 ml de agua destilada
- 1,48 g de fosfato sódico dibásico anhidro
- 0,43 g de fosfato potásico monobásico anhidro
- 7,20 g de cloruro sódico

B.2.- Tampón Tris salino (TBS) 5 mM pH 7,6

- Solución Tris Madre pH 7,6
  - 500 ml de agua destilada
  - 60,57 g de Trizma (Base®)
  - Se añaden 300-400 ml de ácido clorhídrico 1N (458 ml de agua + 42 ml de ácido clorhídrico) hasta conseguir un pH final de 7,6.
- Solución salina fisiológica 0,85%
  - 1000 ml de agua destilada
  - 8,5 g de cloruro sódico
- Solución de trabajo
  - 100 ml solución Tris Madre
  - 900 ml solución salina fisiológica

Para la realización de este apartado se emplearon las muestras fijadas en etanol al 95% que se deshidrataron e incluyeron en parafina, según el protocolo siguiente:

1) Etanol 100º I durante 2 horas y media
2) Etanol 100º II durante 12 horas
3) Xilol I durante 2 horas
4) Xilol II durante 2 horas
5) Parafina I durante 3 horas
6) Parafina II durante 2 horas
7) Realización de los bloques

Los reactivos utilizados en la **puesta a punto** de la técnica inmunohistoquímica se muestran a continuación:

A.- Inhibición de la peroxidasa endógena y desenmascaramiento antigénico

A.1.- Solución inhibidora de la actividad peroxidasa endógena

- 6 ml de peróxido de hidrógeno
- 194 ml de metanol absoluto

A.2.- Desenmascaramiento antigénico

- Tratamiento enzimático con pronasa al 0,005% (proteasa E, tipo XIV, Sigma)
- Calentamiento con microondas
- Hervido de las muestras durante 15 minutos en un medio de citrato 10 mM y pH 6
- Incubación con detergente (1% Triton X-100, Sigma–Aldrich en TBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente

B.- Sueros no inmunes y reactivos específicos

B.1.- Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos

- Seroalbúmina bovina libre de γ-globulinas (BSA) al 5%
- Suero normal de cabra al 10%

B.2.- Anticuerpos primarios

B.2.1.- Anticuerpos primarios probados para la detección de linfocitos B

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
CD79a (Humano)	HM57*	Ratón	1:30, 1:50 y 1:100	Dako
CD79a (Humano)	JCB117*	Ratón	1:30, 1:50 y 1:100	Dako
IgM (µ-heavy chain Humano)	GM01*	Ratón	1:50 y 1:100	LAB VISION
IgM (µ-heavy chain Humano)	Policlonal AB-2	Conejo	1:50 y 1:100	LAB VISION
IgM (µ-heavy chain Humano)	**BAQ44A^{+}***	**Ratón**	**1:200**	**VMRD**

* Anticuerpos monoclonales

B.2.2.- Anticuerpos primarios probados para la detección de linfocitos T

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
CD3 (Humano)	Policlonal	Conejo	1:100, 1:200 y 1:300	Dako
CD3 (Humano)	**Policlonal**	**Conejo**	1:100,1:200 y **1:300**	**Sigma**
CD2 (Humano)	CD2 BAQ95A* Inc.	Ratón	1:100,1:200 y 1:300	VMRD.

* Anticuerpos monoclonales

B.2.3.- Anticuerpos primarios probados para la detección de linfocitos T CD4

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
CD4 (Bovino)	CC8*	Ratón	1:100, 1:200 y 1:300	SEROTEC
CD4 (Bovino)	GC50A1*	Ratón	1:100,1:200 y 1:300	VMRD.

* Anticuerpos monoclonales

B.2.4.- Anticuerpos primarios probados para la detección de linfocitos T CD8

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
CD8 (Bovino)	CC63*	Ratón	1:100, 1:200 y 1:300	SEROTEC
CD8 (Bovino)	CACT80C*	Ratón	1:100,1:200 y 1:300	VMRD.

* Anticuerpos monoclonales

B.2.5.- Anticuerpos primarios probados para la detección de células plasmáticas IgG^+

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
IgG Lambda Light Chains	**Policlonal**	**Conejo**	1:2000, 1:4000, **1:6000**, 1:8000, 1:12000	**Dako**

B.2.6.- Anticuerpos primarios probados para la detección de la subpoblación Gamma-Delta (TcR1δ)

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
Gamma-Delta (TcR1δ)	CACTB6A*	Ratón	1:100,1:200 y 1:300	VMRD

* Anticuerpos monoclonales

B.2.7.- Anticuerpos primarios probados para la detección de las células de Langerhans

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
Células de Langerhans	1CA04*	Ratón	1:100,1:200 y 1:300	Lab Vision

* Anticuerpos monoclonales

B.3.- Anticuerpos secundarios conjugados

Especificidad	Anticuerpo/Clon	Origen	Diluciones	Fuente
Anti-IgG ratón-biotinilado	**Policlonal**	**Cabra**	**1:50**	**Dako**
Anti-IgG conejo-biotinilado	**Policlonal**	**Cabra**	**1:200**	**Vector**

B.4.- Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC, Vector)

- Diluido al 1:50 en PBS. (Esta solución se prepara 30 minutos antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente, y en oscuridad).

C.- Solución de revelado

C.1.- Solución A

- 0,07 g de 3,3-Diaminobencidina (DAB) + 200 ml de tampón TBS
- La solución resultante se agita en oscuridad y se pasa por 3 filtros antes de ser utilizada.

C.2.- Solución B ó de revelado

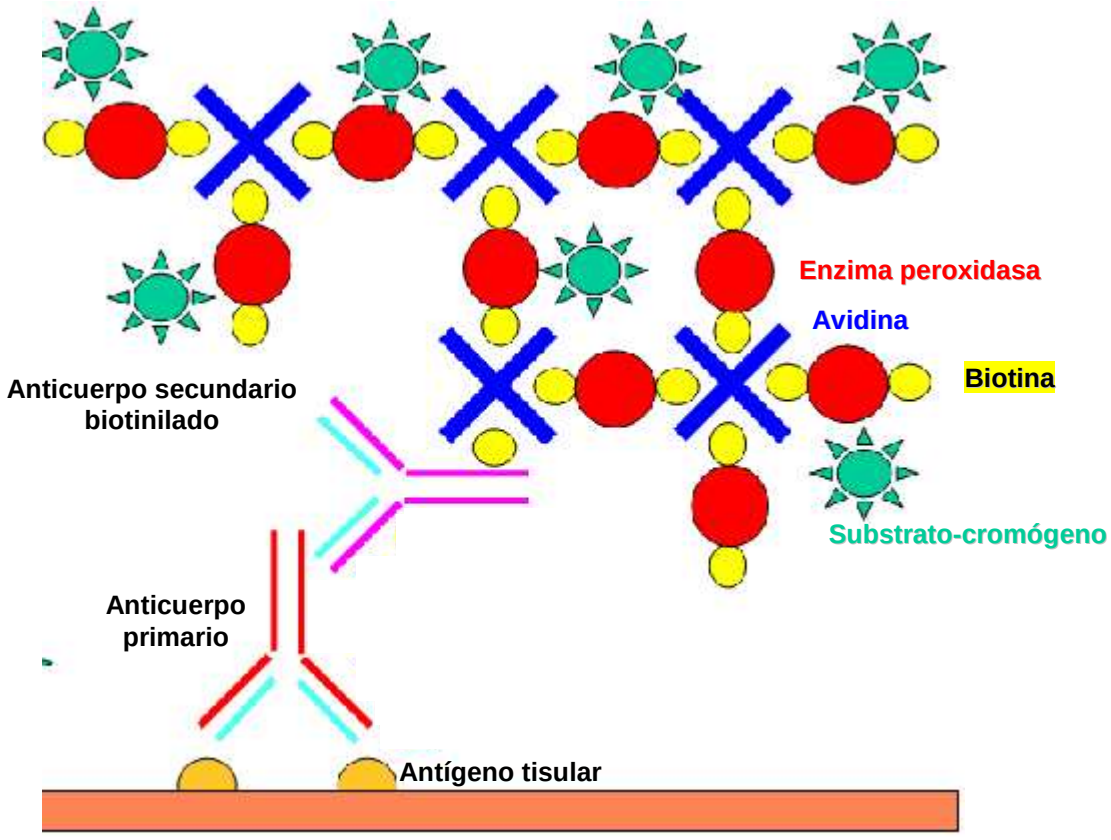
- Se añaden 200 µl de peróxido de hidrógeno a 200 ml de la solución A.

Después de probar los diferentes antígenos y diluciones citados anteriormente, el anticuerpo con el que se obtuvieron los mejores resultados para la detección de los linfocitos B fue el BAQ44A de VMRD, a la dilución de 1:200; para los CD3+ fue el de Sigma, a la dilución 1:300 y para las células plasmáticas el IgG Lambda Light Chains de Dako, utilizando una dilución de 1:6000.

Protocolo de la técnica inmunohistoquímica

Para realizar el estudio inmunohistoquímico se utilizaron muestras fijadas en etanol 95% e incluidas en parafina. El procesado de los tejidos fue el mismo descrito en el estudio histopatológico, con ligeras modificaciones. Las muestras se fijaron en etanol 95% durante 24 horas y se introdujeron inmediatamente en el procesador de tejidos, para evitar dañar los antígenos de los linfocitos. Por otra parte, al recoger los cortes del baño histológico, se utilizaron portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina al 10%.

Para este estudio se puede representar la técnica con el siguiente esquema:



El protocolo resultante para el estudio mediante inmunohistoquímica se muestra en la tabla 1.4.

Tabla 1.4. Técnica inmunohistoquímica para muestras fijadas en etanol

1. **Desparafinado**: tres baños en xilol de 10 minutos cada uno.
2. **Inicio de la rehidratación**: dos baños de 5 minutos cada uno en etanol 100º.
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena**: un baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 6% en metanol durante 30 minutos.
4. **Lavado en PBS** durante 5 minutos.
5. **Desenmascaramiento antigénico**:
   - Para los linfocitos $CD3^+$ y $BAQ44A^+$, se realizó un calentamiento mediante microondas usando ciclos de 4 minutos a 450 W y 2 minutos a 150 W, en un medio con citrato 10 Mm y pH 6.
   - Para IgG^+ se realizó una incubación con detergente durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. **2 lavados en PBS** de 10 minutos cada uno (para frenar la digestión enzimática).
7. **Bloqueo de las uniones inespecíficas**: se incuba en cámara húmeda con BSA al 5% en PBS (30 minutos a temperatura ambiente).
8. **Anticuerpo primario**: se elimina el exceso de BSA al 5% y se incuba 12 horas a 4ºC en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en PBS y suero normal de cabra al 5% y a continuación se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. **2 lavados en PBS** de 10 minutos cada uno.
10. **Anticuerpo secundario biotinilado**: los cortes histológicos se incuban 30 minutos a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario diluído en PBS y suero normal de cabra al 5%.
11. **3 lavados en PBS** de 10 minutos cada uno.
12. **Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC)**: incubación durante 1 hora con el complejo ABC diluído al 1:50 en PBS (1 hora y en oscuridad).
13. **3 lavados en Tris salino (TBS)** de 10 minutos cada uno.
14. **Revelado**: la reacción se reveló mediante un pase de 1 minuto en una solución recién preparada de diaminobencidina (DAB) al 0,035% en TBS con peróxido de hidrógeno al 0,1% y sobre fondo blanco.

15. **Frenado del revelado**: lavado en agua corriente durante 10 minutos.
16. **Contratinción con hematoxilina**: 1 minuto.
17. **Lavado**: 3 minutos en agua corriente.
18. **Deshidratación**: mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos.
19. **Montaje de las preparaciones**: aplicando una gota de DPX al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos.

En este ensayo se usaron los siguientes controles:

- Controles positivos: se utilizaron cortes de ganglio linfático mediastínico de vacas con larvas 1 de *Hypoderma lineatum* en su esófago.

- Controles negativos: se usaron cortes seriados de los ganglios anteriores en los que el anticuerpo primario se sustituyó por suero normal de cabra al 5% en PBS.

Para realizar el recuento de las células con reacción positiva a los distintos anticuerpos, se observó toda la superficie de la muestra a 400 aumentos, que como ya se señaló anteriormente era de 25 mm^2.

Para cada uno de los distintos anticuerpos (CD3, BAQ44A e IgG) se realizó un estudio cuantitativo y se observó la distribución de las células positivas en las distintas capas dérmicas: epidermis, dermis superficial, dermis profunda e hipodermis.

3.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 6.1.3 SPSS Inc, Chicago (1995).

El análisis estadístico comprendió la determinación de los parámetros descriptivos, media y desviación estándar, de las variables valoradas tanto en el estudio histopatológico (eosinófilos) como inmunohistoquímico (linfocitos T, B y células plasmáticas). La determinación de los valores de cada animal se obtuvo a partir de la observación de un área de 25,3±1,24 mm^2.

La evolución de las distintas poblaciones celulares en los distintos grupos a lo largo del tiempo se analizó mediante la prueba de análisis de varianza de muestras repetidas, empleando el contraste de diferencias para comprobar si en las sucesivas muestras había diferencias significativas con respecto a la media de las muestras previas. Se empleó el contraste simple para detectar las posibles diferencias entre los distintos grupos de animales en cada toma.

La correlación entre distintos tipos celulares (linfocitos T/B, linfocitos B/células plasmáticas) se llevó a cabo mediante el test de correlación de Pearson.

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

3.3.1.1.- VALORACIÓN DE LOS INFILTRADOS LINFOPLASMOCITARIOS

En la foto 3 se puede observar como la piel de los **animales testigo** no presentaba ningún tipo de alteración, mostrando una arquitectura típica. La epidermis estaba compuesta en su mayoría por queratinocitos, mientras que en la dermis se puede observar una zona superficial en la cual se encuentran abundantes fibras de colágeno que se disponen de forma paralela. Entre estas fibras se encuentra una población normal de células inflamatorias en la que hay linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. En esta capa también se observan numerosos folículos pilosos. A continuación se encuentra la dermis reticular o profunda, caracterizada por la abundancia de tejido conjuntivo denso. En esta capa las células son escasas, ya que apenas está vascularizada.

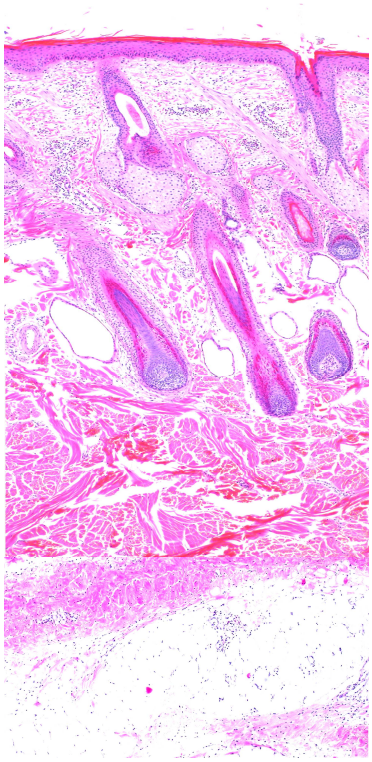


Foto 3.- Aspecto de la piel en los animales testigo

Finalmente se ve la hipodermis, constituida por tejido conectivo laxo. Este estrato subcutáneo está formado por numerosos vasos sanguíneos y troncos nerviosos. Destaca una mayor presencia de células distribuidas de forma perivascular.

Como ya se indicó anteriormente, la piel de las vacas que se mantuvieron sin infestar no presentó ninguna alteración aparente, ni tampoco evidenció un incremento significativo en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas.

En el grupo de **animales primoinfestados** se observó una ligera reacción inflamatoria en la piel entre las 6 y 96 h.p.i., y se apreciaron además, pequeñas escaras y costras a nivel epidérmico. A las 48 h.p.i. la reacción cutánea se caracterizó por un infiltrado inflamatorio moderado en la dermis superficial, tal como se observa en la Foto 4A. Este infiltrado estaba compuesto por células mononucleares y, ocasionalmente por polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos (Foto 4B).

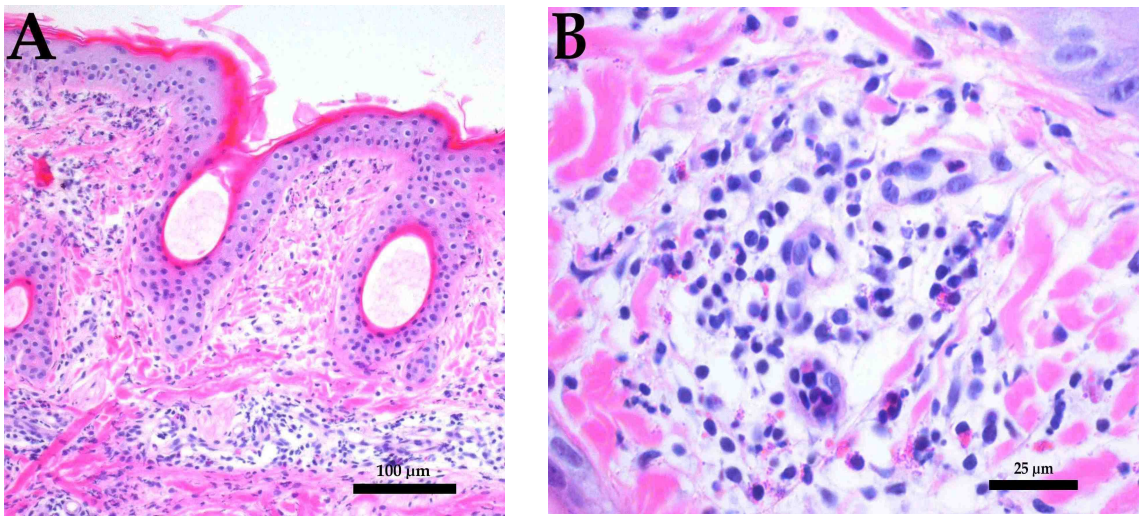


Foto 4.- (A) Infiltrado inflamatorio moderado en animales primoinfestados a las 48 h.p.i. compuesto principalmente por células mononucleares (B)

Estos hallazgos histopatológicos indican que en los animales primoinfestados, la penetración de las L-1 a través de la piel provoca una respuesta moderada en la dermis superficial. Además, el desarrollo de esta respuesta es relativamente lento, puesto que los infiltrados celulares no se observaron hasta las 48 h.p.i.

Estos resultados contrastan con los de Nelson y Weintraub (1972), quienes observaron en ganado vacuno no sensibilizado previamente por *H. lineatum* la movilización de un gran número de neutrófilos en el interior de las vénulas, aunque

éstos raramente pasaban hacia los tejidos circundantes.

Este acúmulo de células en fases tempranas de la infestación también lo observaron van den Broek y col. (2004) en ganado ovino primoinfestado por *Psoroptes* sp., con un aumento significativo en el número de eosinófilos y neutrófilos en las primeras 24 h.p.i.

En los **animales reinfestados** la respuesta celular en el área de penetración de las larvas fue mucho más intensa y extensa desde el comienzo de la reinfestación. Así a las 6 h.p.i., ya pudo observarse a nivel de la dermis superficial un infiltrado perivascular moderado (Foto 5A), compuesto principalmente por células mononucleares (Foto 5B).

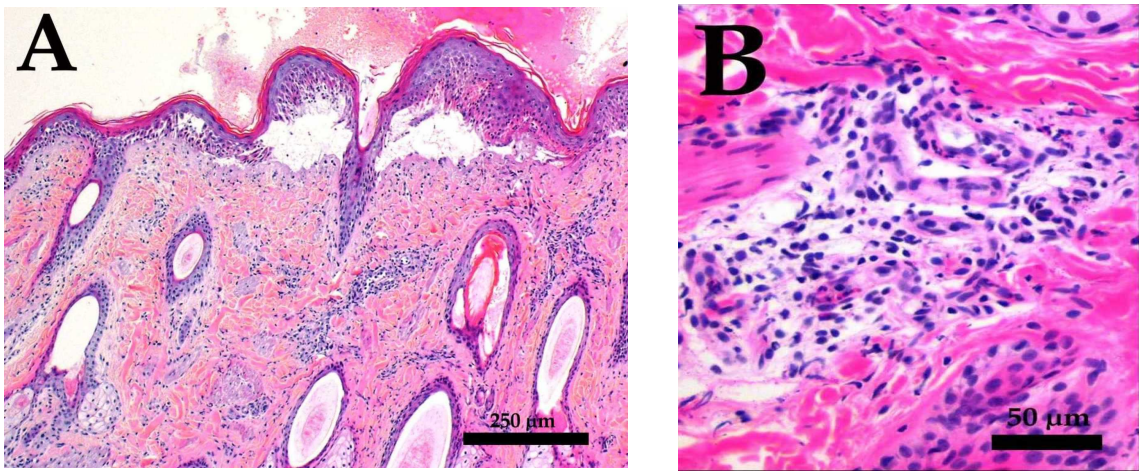


Foto 5.- (A) Infiltrado perivascular moderado en animales reinfestados a las 6 h.p.i., compuesto principalmente por células mononucleares (B)

A las 12 h.p.i la reacción cutánea se intensificó considerablemente con la aparición de infiltrados inflamatorios perivasculares, en los que pudo observarse un elevado número de células mononucleares y eosinófilos (Foto 6).

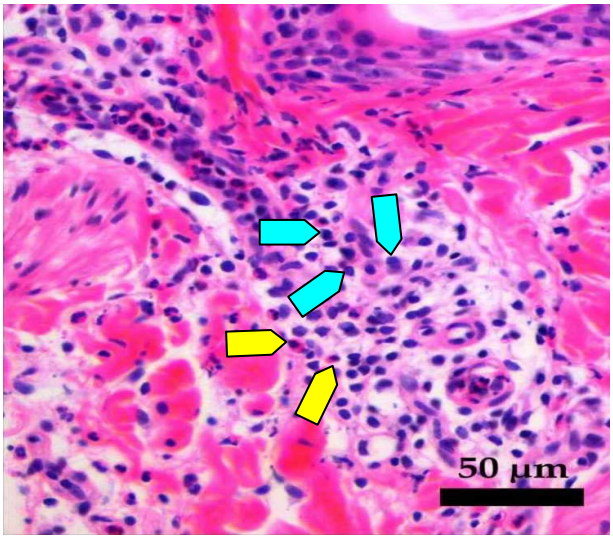


Foto 6.- Infiltrado perivascular en animales reinfestados a las 12 h.p.i. con un elevado número de mononucleares ( ) y eosinófilos ( )

Finalmente, tras 48-96 h.p.i. la reacción inflamatoria cutánea fue mucho más intensa, afectando tanto a la dermis superficial como a la profunda e incluso a la hipodermis (Foto 7). Este fuerte infiltrado inflamatorio también afectó a los vasos de la dermis e hipodermis, y estaba integrado fundamentalmente por polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. Estas lesiones sugieren un proceso de naturaleza alérgica probablemente como consecuencia del desarrollo de una reacción de hipersensibilidad tipo III frente a la primera y sucesivas reinfestaciones.

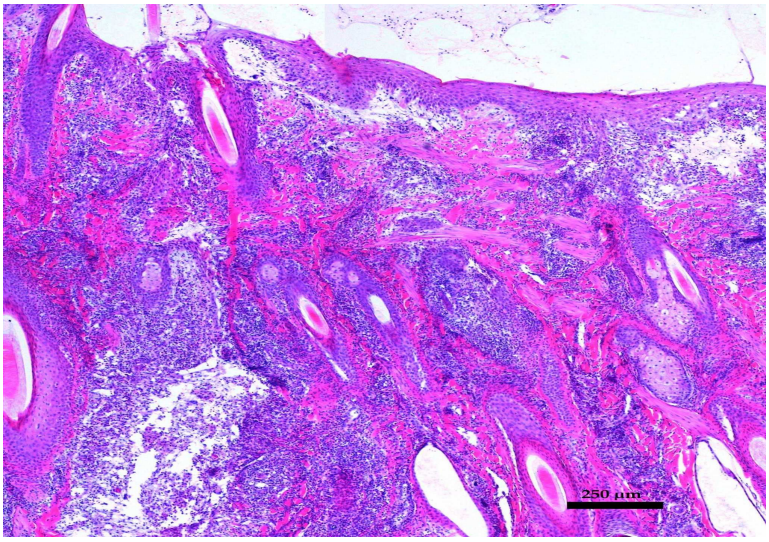


Foto 7.- Infiltrado inflamatorio intenso afectando a la dermis e hipodermis en animales reinfestados a las 96 h.p.i.

De acuerdo con Gingrich (1980), los animales que se encuentran sensibilizados por varias infestaciones previas oponen mayor resistencia a la penetración de una nueva generación de larvas mediante una intensa respuesta inflamatoria, y esto supone un cierto grado de resistencia que se manifiesta en la piel y en los trayectos de migración que siguen las larvas. Por otra parte, según Colwell (1991), Chabaudie y Boulard (1993) y Panadero y col. (2009) la ausencia de reacción en los animales primoinfestados podría estar relacionada con la acción inmunosupresora de las hipoderminas larvarias que tenderían a reducir la respuesta inflamatoria del hospedador, con el consiguiente retraso en el desarrollo de la respuesta inmune.

Esta resistencia adquirida se inicia con la primera infestación y no alcanzaría su máxima eficacia hasta la tercera o cuarta infestación, apreciándose una reducción, en algunos casos muy importante, del número de barros en el dorso de los animales, así como una menor viabilidad de las L-3 en relación con anteriores parasitaciones (Gingrich, 1982; Pruett y Barret, 1985; Baron y Weintraub, 1987). Durante la fase de reposo en los lugares de estancia invernal, la falta de estímulo antigénico por parte de las larvas hace que la respuesta celular y, por lo tanto, la mortalidad larvaria sean prácticamente inexistentes.

En otras miasis, como la provocada por *Oestrus ovis,* la invasión de las larvas produce una inflamación de las mucosas con una respuesta inmunitaria celular caracterizada fundamentalmente por el aumento de eosinófilos, mastocitos y linfocitos (Yacob y col*.,* 2004).

De acuerdo con otros autores (Rovere y Nunez, 1977; Stromberg y Fisher, 1986; Rosa y Moschini, 1988; van den Broek y col., 2000), las lesiones cutáneas en ovejas y vacas con sarna psoróptica están caracterizadas por un infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos y con un número más reducido de neutrófilos y mastocitos. Posteriormente, van den Broek y col. (2003) también coincidieron en señalar que este ácaro, además de estimular una respuesta celular muy temprana, genera respuestas de hipersensibilidad retardada con un infiltrado en el que abundan los eosinófilos.

3.3.1.2.- RESPUESTA EOSINOFÍLICA

Con respecto al recuento de eosinófilos, en los animales de los grupos testigo (G-1) y primoinfestado (G-2) su número fue reducido a lo largo de todo el estudio (Figura 1.1). Por el contrario, el grupo reinfestado (G-3) mostró un aumento continuo desde las 6 (176,2±79,02 eosinófilos/sección) hasta las 48 h.p.i. (1427,7±1056,24 eosinófilos/sección), con un ligero descenso a las 96 h.p.i.

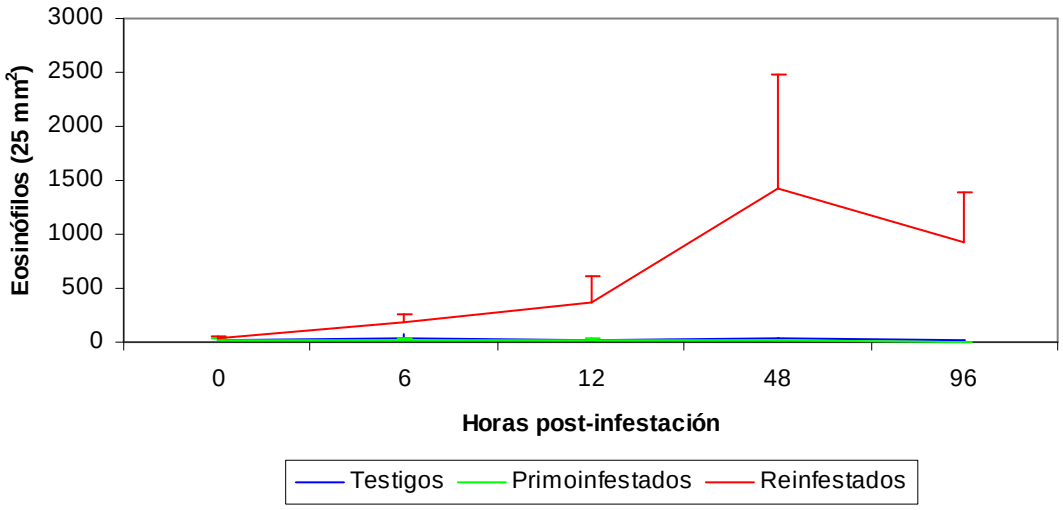


Figura 1.1.- Evolución del número de eosinófilos a nivel dérmico en los tres grupos de animales

El test ANOVA de muestras repetidas mostró un aumento significativo en el número de eosinófilos del G-3 a lo largo del estudio (Prueba de Wilks: F= 21,587; *p*< 0,001). La prueba de contraste de Diferencia mostró un aumento significativo a las 6 (F= 14,236; *P*= 0,002), 12 (F= 6,751; *P*= 0,016) y a las 48 h.p.i. (F= 5,541; *P*= 0,027).

Por otra parte, al comparar los tres grupos de animales mediante la prueba de contraste Simple, se observó que G-1 y G-2 presentaban poblaciones de eosinófilos similares y que ambos eran estadísticamente diferentes de G-3 a las 6 (t= 4,582; *P*= 0,002 para G-1 y t= 4,659; *P*= 0,001 para G-2), 12 (t= 3,243; *P*= 0,010 y t= 3,117; *P*= 0,012) y a las 48 h.p.i. (t= 2,864; *P*= 0,018 y t= 2,902, *P*= 0,017 para G-1 y G-2, respectivamente).

De esta forma se evidenció que, cuando los animales ya estaban sensibilizados por infestaciones anteriores, la respuesta cutánea era mucho más intensa, con infiltrados perivasculares que ya eran visibles a las 6 h.p.i. Los eosinófilos fueron abundantes en el infiltrado a las 12 h.p.i., confirmando que su participación en la reacción cutánea frente a la penetración de las L-1 de *H. lineatum,* requiere la sensibilización previa frente al parásito (Nelson y Weintraub, 1972; Panciera y col., 1993).

Respecto a su localización, estas células se encontraban fundamentalmente alrededor de los plexos vasculares de la dermis superficial y profunda (Fotos 8A y 8B), a diferencia de Huntley y col. (2005), quienes en ovejas con sarna psoróptica observaron una rápida afluencia de eosinófilos hacia la epidermis. Además, en algunas secciones hallaron pústulas localizadas en el estrato córneo en las que había un importante número de eosinófilos.

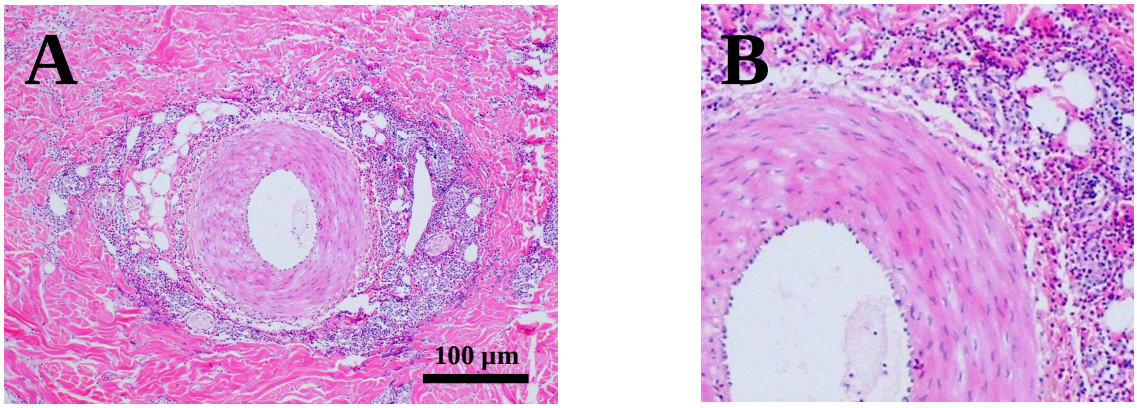


Foto 8.- Infiltrado inflamatorio perivascular (A) en el que se observan abundantes eosinófilos (B)

El hecho de que los animales reinfestados posean una respuesta eosinófilica más intensa, confirma los resultados de Nelson y Weintraub (1972), Colwell (1989) y Nelson (1987), quienes encontraron una relación inversa entre la supervivencia larvaria en animales previamente infestados y los niveles de eosinofilia. Estos autores han demostrado que durante la invasión de la piel, la intensidad de la respuesta celular eosinofílica aumenta con el número de exposiciones anteriores, observándose en el trayecto de entrada en animales reinfestados un abundante infiltrado eosinofílico próximo al extremo posterior de la larva. Al mismo tiempo, se aprecia una rápida elevación de eosinófilos en sangre, que alcanza un máximo a los 7-20 días de la entrada de la larva. Estas cifras se mantienen relativamente altas durante la fase

migratoria, para volver a incrementarse coincidiendo con la aparición de las larvas en el dorso.

No obstante, nuestros resultados contrastan con los obtenidos por diversos autores con ectoparásitos como por ejemplo: *Lucilia* (Bowles y col., 1992), garrapatas (Addul-Amir y Gray, 1987), piojos (Milnes y col., 2007) y melófagos (Nelson y Kobud, 1980), en los cuales el incremento de los eosinófilos durante las primoinfestaciones y reinfestaciones seguía patrones similares.

Doby y col. (1987) en casos de hipodermosis humana, observaron que la hipereosinofilia se mantiene mientras las larvas realizan su actividad secretora-excretora en los tejidos profundos, pero el número de eosinófilos recupera la normalidad cuando cesa esa actividad, es decir, cuando las larvas son destruidas.

3.3.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

3.3.2.1.- LINFOCITOS T

Al estudiar los linfocitos T observamos que los **animales testigo** mostraban una población de células $CD3^+$ a nivel dérmico muy reducida (Figura 1.2), oscilando su número entre un mínimo a las 0 h.p.i. (26,2±10,28 células/sección) y un máximo a las 96 h.p.i. (62±51,49 células/sección).

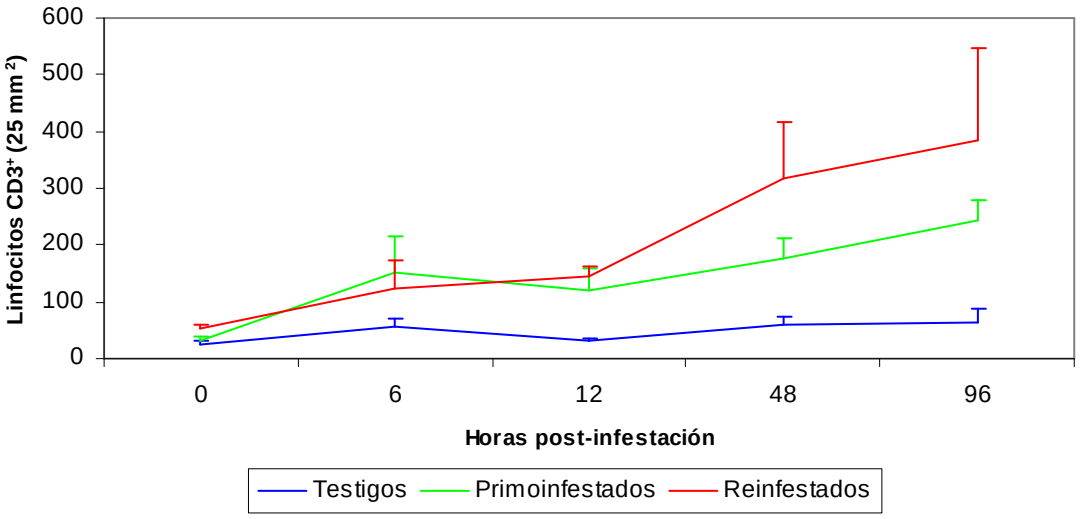


Figura 1.2.- Evolución del número de linfocitos T $CD3^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En estos animales los linfocitos T se distribuían fundamentalmente alrededor de los plexos vasculares de la dermis superficial (Foto 8A) y en menor medida en los de la profunda (Foto 8B). Esta distribución coincide con Hein y Dudler (1997) quienes observaron que, en la piel normal de ganado vacuno, la mayoría de las células T (82%) se localizaban en los primeros milímetros de la dermis superficial.

En los **animales primoinfestados** el número inicial de células T fue moderado, si bien fue aumentando progresivamente a lo largo del estudio, con un número que fluctuó entre 32,7±9,77 a las 0 h.p.i. y 244,7 ± 68,81 a las 96 h.p.i. (Figura 1.2).

En cuanto a su localización, éstas células formaban un infiltrado perivascular moderado y se distribuían en una proporción similar en la dermis superficial y profunda (Foto 9A´ y 9B´).

En los **animales reinfestados** el número de linfocitos T aumentó considerablemente a lo largo del estudio, con valores máximos a las 96 h.p.i. (385,2±162,51), observándose un intenso infiltrado perivascular, con una distribución uniforme de las células $CD3^+$ en la dermis superficial y profunda (Figura 9A´´ y 9B´´).

El análisis de varianza de muestras repetidas indicó que el número de células $CD3^+$ varió de forma significativa a lo largo del estudio al considerar los tres grupos de animales en conjunto (Prueba de Wilks: F= 5,414; *P*= 0,034). El contraste de Diferencia mostró diferencias a las 6 (F= 8,586; *P*= 0,017), 48 (F= 9,644; *P*= 0,013) y 96 h.p.i. (F= 7,918; *P*= 0,020).

En un estudio realizado en ovejas con sarna psoróptica (Huntley y col., 2005), los incrementos de las células T CD3 ocurrían de forma más tardía (5ª sem. p.i.).

Al comparar los distintos grupos de animales entre sí, mediante contraste Simple, se encontraron diferencias significativas entre los animales reinfestados (G-3) y testigos (G-1) a las 48 h.p.i. (t= 2,335; *P*= 0,044).

De forma similar, Milnes y col. (2007), en ganado vacuno infestado por los piojos *Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus,* observaron que los linfocitos T CD3 en las vacas infestadas, eran significativamente superiores a las sanas.

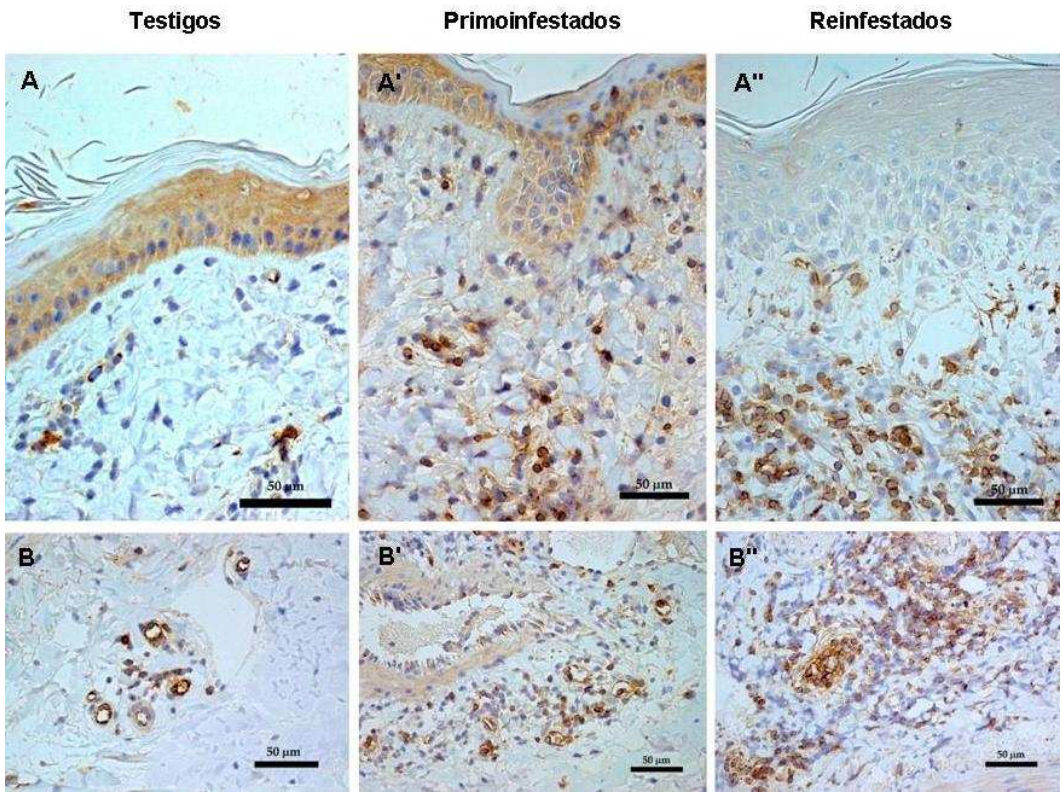


Foto 9.- Población de linfocitos T CD3^{+} en la dermis superficial (A, A' y A'') y profunda (B, B' y B'') de los animales testigos, primoinfestados y reinfestados

En otras miasis, los linfocitos T también juegan un importante papel durante la fase de invasión cutánea; así Bowles y col. (1994) y Elhay y col. (1994) detectaron en ovejas infestadas por *Lucilia cuprina* un incremento durante las primeras 48 h.p.i. Este incremento se producía tanto en los animales primoinfestados como reinfestados, si bien en estos últimos se producía de manera más precoz. Posteriormente, y siguiendo en esta misma línea, Bowles y col. (1996) en un ensayo vacunal frente a esta miasis observaron una población importante de estas células en infiltrados inflamatorios localizados en la dermis. Sin embargo, Nash y col. (1996) no encontraron un incremento de las células T en las primeras horas tras la invasión larvaria; al contrario, demostraron una afluencia y una acumulación de linfocitos B en el área inmediatamente adyacente al sitio de infección.

El acumulo de células T en la dermis de los animales reinfestados se explicaría, en opinión de MacKay (1992) y Washington y col. (1995), porque la mayoría de las células presentes en la linfa aferente que drena la piel son células T de memoria, que recirculan preferentemente a través de los tejidos finos periféricos y células T γσ características de la piel.

3.3.2.2.- LINFOCITOS B

Como se puede apreciar en la figura 1.3, en los **grupos testigo** y **primoinfestado** los linfocitos B (BAQ44A$^+$) permanecieron en niveles constantes e inferiores a 150 linfocitos/sección a lo largo del estudio.

Estas células se encontraban distribuidas uniformemente en torno a los plexos capilares de la dermis superficial (Fotos 11A y 11B) y profunda (Fotos 10A'y 10B').

En los **animales reinfestados** el número de linfocitos B osciló notablemente a lo largo del estudio. Así, observamos un incremento a las 6 h.p.i. que se hace más evidente a partir de las 12 h.p.i., alcanzándose un máximo a las 48 h.p.i. (600,5±668,92 células/sección).

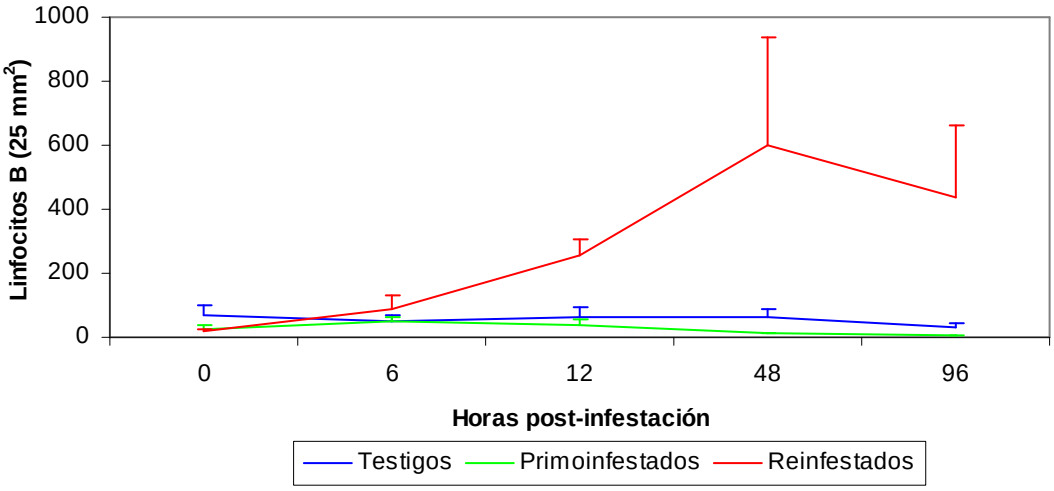


Figura 1.3.- Evolución del número de linfocitos B a nivel dérmico en los tres grupos de animales

Al estudiar la evolución de este grupo de células se observa que el análisis de varianza de muestras repetidas mostró diferencias a lo largo del tiempo (Prueba de Wilks: F= 3,667; *P*= 0,021). El contraste de Diferencia mostró diferencias estadísticamente significativas a las 12 h.p.i. (F= 9,901; *P*= 0,012). La prueba de contraste Simple indicó que G-3, es decir, los animales reinfestados, presentaban un aumento en el número de linfocitos B marcados con el anticuerpo BAQ44A significativamente mayor que los animales de los grupos 1 (t= 3,741; *P*= 0,005) y 2 (t=

3,699; *P*= 0,005) en las muestras de piel tomadas a las 12 h.p.i.

Con respecto a la distribución de estas células, los animales reinfestados presentaron un gran número en la dermis que se localizaban principalmente alrededor de los plexos profundos (Foto 10B''), mientras que solamente unas pocas se encontraron en los plexos superficiales (Foto 10A'').

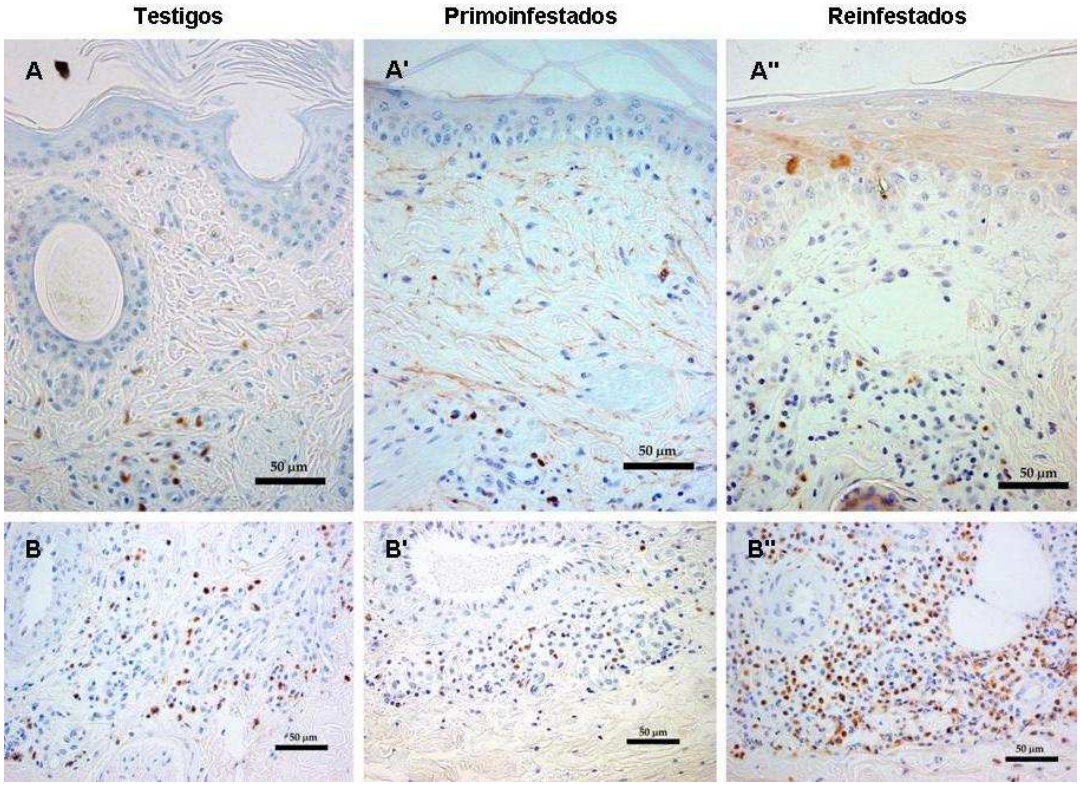


Foto 10.- Población de linfocitos B marcados con el anticuerpo BAQ44A$^+$ en la dermis superficial (A, A' y A'') y profunda (B, B' y B'') de los animales testigos, primoinfestados y reinfestados

Estos resultados corroboran lo obtenido en el estudio histopatológico, confirmando que la respuesta inmune celular en animales primoinfestados, representada por una infiltración perivascular de células BAQ44A$^+$, fue también moderada. En este sentido, Nelson y Weintraub (1972) comprobaron una ausencia de respuesta inflamatoria celular alrededor de las larvas en animales primoinfestados.

Por el contrario, en ganado reinfestado, la respuesta inmunitaria celular es mucho más intensa debido a que se genera una respuesta de memoria específica frente a sucesivas infestaciones. Los linfocitos T y B de memoria son responsables de

la capacidad del animal para desarrollar una respuesta en caso de una reexposición.

La importancia de los linfocitos B en las reinfecciones también fue descrita por Herbert y col. (2002) quienes encontraron en ratones primoinfectados con *Strongyloides stercoralis* que estas células apenas participaban en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, si bien resultaban esenciales en los ratones reinfectados. Por el contrario, Boppana y col. (2004) en ovejas parasitadas por garrapatas del género *Hyaloma*, apreciaron un aumento significativo de los linfocitos B tanto en primoinfestaciones como en reinfestaciones.

La participación de los linfocitos B en la respuesta frente a otras miasis fue detectada con anterioridad por Bowles y col. (1992) y Elhay y col. (1994) quienes afirmaron que en las 6 primeras horas tras la infestación por L-1 de *Lucilia cuprina* aparecía una afluencia y una acumulación de linfocitos B en el área inmediatamente adyacente al lugar de infección, aunque la epidermis permanecía intacta. En un trabajo posterior, Nash y col. (1996) estudiaron la población celular en los ganglios linfáticos regionales, hallando un incremento tardío de estas células que se relacionaba con niveles máximos de anticuerpos; no obstante, en las primeras 48 h.p.i. apenas hallaron linfocitos B ni linfocitos T CD8, lo que sugeriría un cierto grado de acumulación selectiva en la lesión.

En infestaciones por otros artrópodos la participación de los linfocitos B también es más tardía como demostraron van den Broek y col. (2005), en ovejas parasitadas por *Psoroptes ovis*, en las que se incrementaron cuatro días después de la infestación. No obstante, a los 63 d.p.i. el recuento de las células en piel normal y lesionada no mostraban diferencias, excepto en los linfocitos B que eran significativamente más altos en ésta última.

3.3.2.3.- CÉLULAS PLASMÁTICAS

Al igual que ocurrió con los linfocitos B, el número de células plasmáticas IgG^+ en los **animales testigo** y **primoinfestados** apenas varió a lo largo del estudio; únicamente en los animales infestados por primera vez se apreció un ligero aumento en el número de células marcadas a las 48 h.p.i., si bien no fue significativo.

Por el contrario, en los **animales reinfestados** el número de células IgG^+ se incrementó considerablemente desde 8,2±6,5 células/sección al principio del ensayo (0 h.p.i.) hasta alcanzar un máximo a las 48 horas post-infestación (125,5±13,3 células/sección).

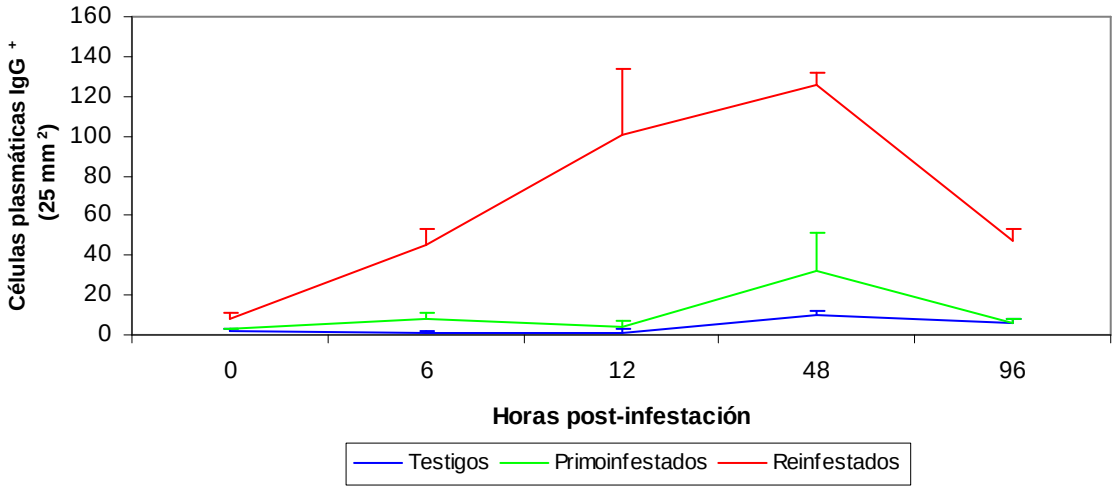


Figura 1.4.- Evolución del número de células plasmáticas IgG^+ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

El análisis de varianza de muestras repetidas mostró diferencias significativas en el número de estas células a lo largo del tiempo (Prueba de Wilks: F= 3,667; *P*= 0,021). El contraste de Diferencia mostró variaciones significativas a las 6 (F= 24,001; *p*< 0,001), 12 (F= 4,457; *P*= 0,045), 48 (F= 5,936; *P*= 0,023), y 96 h.p.i (F= 14,679; *P*= 0,001).

Al comparar el comportamiento de los tres grupos de animales mediante contraste Simple se observó que, en los animales reinfestados, el número de células marcadas fue significativamente superior respecto de los testigos y primoinfestados a

las 6 (t= 6,441; *p*< 0,001 con respecto a G-1 y t= 5,431; *p*< 0,001 para G-2), 12 (t= 2,564; *P*= 0,030 y t= 2,607; *P*= 0,028), 48 (t= 3,343; *P*= 0,009 y t= 2,394; *P*= 0,040), y 96 h.p.i (t= 5,275; *p*< 0,001 y t= 3,710; *P*= 0,005, para G-1 y G-2, respectivamente).

En relación con la distribución de estas células, los animales reinfestados presentaron un gran número en la dermis localizándose principalmente alrededor de los plexos profundos (Foto 11B''), mientras que en los plexos superficiales su número era menor (Foto 11A'').

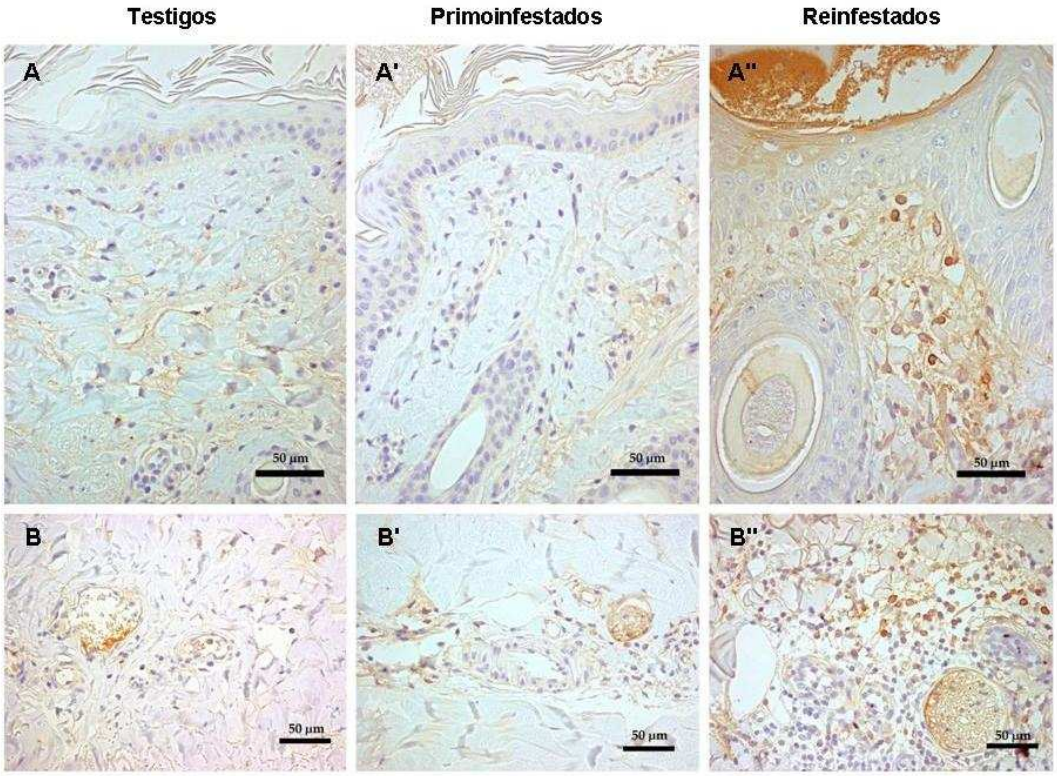


Foto 11.- Población de células plasmáticas IgG$^+$ marcadas en la dermis superficial (A, A' y A'') y profunda (B, B' y B'') de los animales testigos, primoinfestados y reinfestados

En este estudio las células plasmáticas IgG fueron más abundantes en los animales reinfestados. Colwell y Baron (1988, 1990) demostraron mediante ELISA indirecto que la elevación de los niveles de IgG en el suero era más temprana en los animales reinfestados (30 d.p.i.) que en los primoinfestados (60-90 d.p.i.). En ambos grupos de animales los niveles de anticuerpos se incrementaban durante 3-4 semanas, coincidiendo con la migración de las larvas hacia el esófago y alcanzaban el nivel máximo 1-2 semanas antes de la aparición del número más elevado de nódulos en el

dorso (37-43 sem. p.i.), debido a la liberación masiva de enzimas que lleva consigo la muda larvaria (Boulard, 1969); sin embargo, esta reacción es de corta duración, se atenúa rápidamente y tiende a anularse una vez que todas las larvas han pasado al segundo y tercer estadio. En opinión de Pruett y col. (1987), este descenso del título de anticuerpos es especialmente importante en animales que sufren su primera infestación.

En animales con diferentes temporadas de pastoreo, la cinética de la respuesta anticuerpo básicamente es la misma; sin embargo, en general, se observan títulos más bajos en los animales de más edad, lo que viene a demostrar que las sucesivas reinfestaciones influyen considerablemente sobre la intensidad de la respuesta inmune (Panadero, 1996).

Aunque no se ha encontrado por el momento relación entre los títulos de anticuerpos y la resistencia adquirida del hospedador, algunos autores (Baron y Weintraub, 1987; Colwell, 1985) apuntan una correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular en animales resistentes, previamente infestados y el nivel de protección.

3.3.2.4.- RELACIONES ENTRE DISTINTAS POBLACIONES CELULARES

3.3.2.4.1.- RELACIÓN LINFOCITOS T/LINFOCITOS B

Los linfocitos son las células responsables de las respuestas inmunitarias que se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y que se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente.

Para comprobar la importancia de cada una de las poblaciones linfocitarias, es decir, conocer si en la infestación por larvas 1 de *Hypoderma lineatum* predominan los linfocitos T o los B se calculó el coeficiente linfocitos T/B que aparece representado en la tabla siguiente:

Linfocitos T/B	0 h.p.i.	6 h.p.i.	12 h.p.i.	48 h.p.i.	96 h.p.i.
Testigos	0,37	1,07	0,48	0,91	2,12
Primoinfestados	1,41	3,14	3,28	17,68	51,53
Reinfestados	2,74	1,43	0,57	0,53	0,88

Tabla 1.5.- Coeficiente linfocitos T/B en los distintos grupos de animales

De esta forma podemos observar que en la piel de los **animales testigo** que permanecieron sin infestar durante todo el estudio, y sin ningún tipo de contacto con otros ectoparásitos, el coeficiente osciló ligeramente a lo largo de los muestreos. En estos animales ambas poblaciones se mantuvieron bastante igualadas, si bien al principio de estudio predominaban los linfocitos B. Por el contrario, en la última biopsia (96 h.p.i.) el número de linfocitos T duplicó al de los linfocitos B (Figura 1.5).

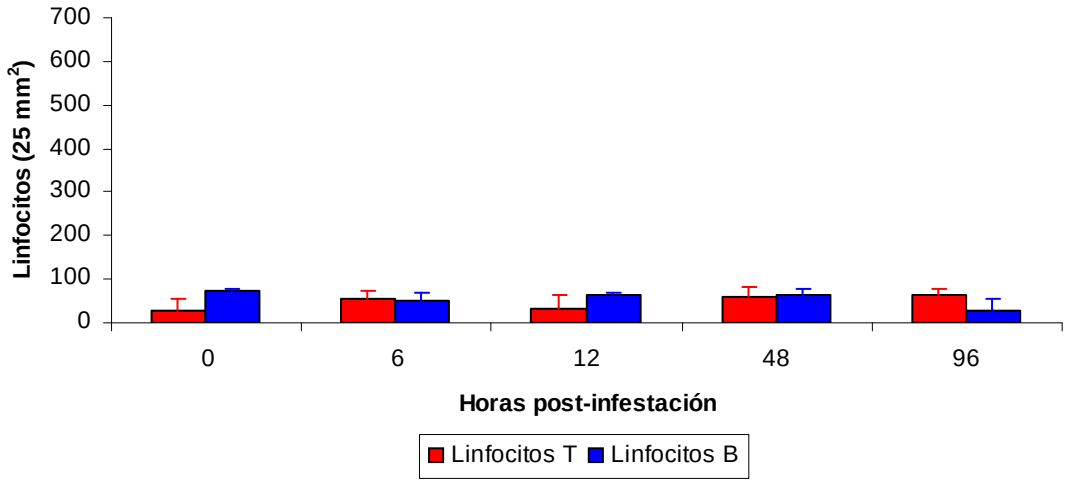


Figura 1.5.- Relación entre el número de linfocitos T y B a nivel dérmico en los animales testigo

Estos resultados contrastan con los de Hein y Mackay (1991), Watson y col. (1994) y McElroy y col. (1998), quienes observaron en piel normal de vacuno una predominancia de los linfocitos T.

Mediante el test de correlación de Pearson no se encontró una correlación significativa entre ambos grupos linfocitarios a lo largo del estudio (P>0,05).

En el **grupo primoinfestado** los linfocitos T fueron mucho más abundantes que los linfocitos B, aumentando progresivamente hasta alcanzar un cociente de 51,53 a las 96 h.p.i. (Tabla 1.5). En la figura 1.6 se puede apreciar como los linfocitos T CD3 se fueron incrementando paulatinamente a lo largo del estudio, mientras que los linfocitos B se mantuvieron más constantes y con una tendencia a la baja. Este predominio de los linfocitos T podrían llegar a jugar un papel importante en la adquisición de resistencia frente al parásito como indican otras investigaciones llevadas a cabo por Wikel y Allen (1976) en ratones infestados por *Dermacentor andersoni.*

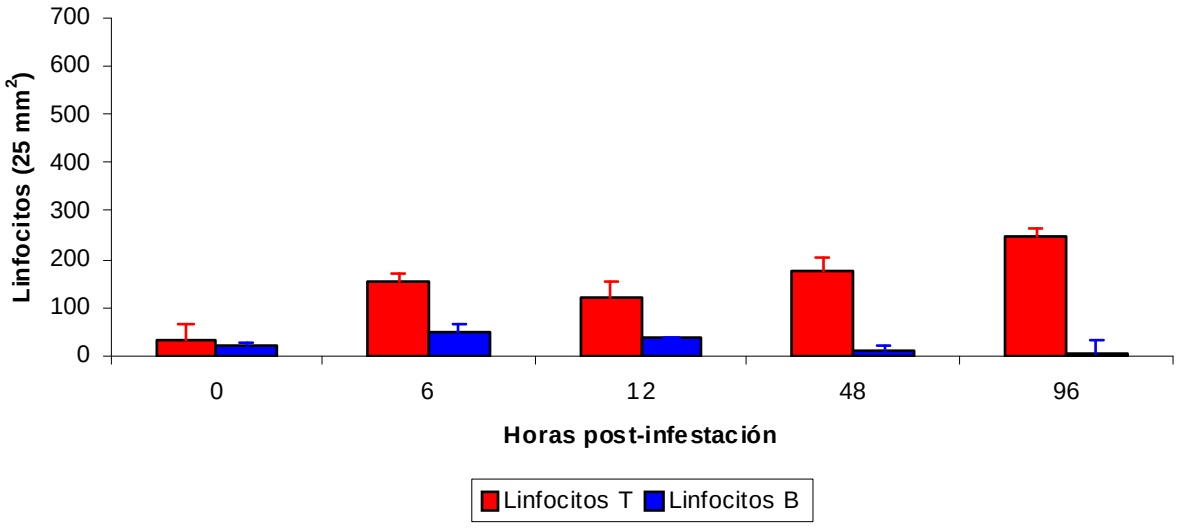


Figura 1.6.- Relación entre el número de linfocitos T y B a nivel dérmico en los animales primoinfestados

Es de destacar la escasa participación de los linfocitos B en los animales primoinfestados. Estos resultados contrastan con los de van den Broek y col. (2005), quienes en trabajos con ovejas infestadas por *Psoroptes ovis* afirman que los productos antigénicos provocan el reclutamiento precoz de un considerable número de linfocitos T y B, con aumentos significativos de ambas poblaciones a los 4-8 días post-infestación.

Mediante el test de correlación de Pearson no se encontró una correlación significativa entre ambos grupos linfocitarios a lo largo del estudio ($P > 0,05$).

Por el contrario, en los **animales reinfestados** se detectó un descenso

progresivo del cociente linfocitos T/B (Tabla 1.5). Si bien los linfocitos T experimentaron un incremento progresivo a lo largo del estudio, la población predominante fue la de los linfocitos B que se incrementó desde el inicio de la reinfestación con 19,2±5,91 células/sección hasta un máximo de 600,5±668,92 a las 48 h.p.i., para posteriormente comenzar a descender hacia el final del estudio (Figura 1.7).

Mediante el test de correlación de Pearson se encontró una correlación positiva entre ambos grupos linfocitarios a las 96 horas p.i. (r= 0,998; *P*= 0,002).

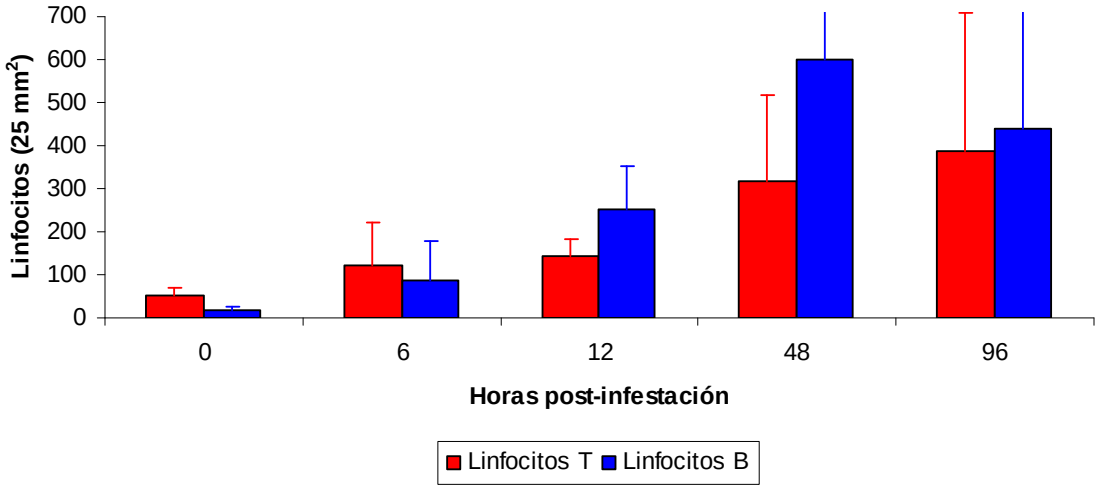


Figura 1.7.- Evolución del número de linfocitos T y B a nivel dérmico en los animales reinfestados

De esta forma, comprobamos que el cociente linfocitos T/B disminuía conforme aumentaba el tiempo de infestación, observándose una mayor participación de los linfocitos B en los animales reinfestados, mientras que en los primoinfestados apenas están representados, lo que indicaría el desarrollo de una inmunidad adquirida de tipo humoral en los animales reinfestados en la que estarían implicados los linfocitos B. Esta respuesta de memoria resulta de gran importancia en la adquisición de resistencia frente a la infestación por *Hypoderma*, así Evstaf'ev (1980) comprobó que animales que tenían ligeras infestaciones el primer año o que habían recibido un tratamiento insecticida temprano experimentaban infestaciones más intensas al año siguiente. Por el contrario, las vacas que habían estado fuertemente infestadas en el primer año eran menos susceptibles a la parasitación en años sucesivos y por tanto presentaban un número menor de larvas que completaban el ciclo.

3.3.2.4.2.- RELACIÓN LINFOCITOS B/CÉLULAS PLASMÁTICAS

Cuando un linfocito B entra en contacto con un antígeno procedente de un agente invasor, como es el caso de las larvas 1 de *H. lineatum,* se activa y comienza a dividirse, transformándose en células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos para marcar y señalar a todos los antígenos del agente invasor.

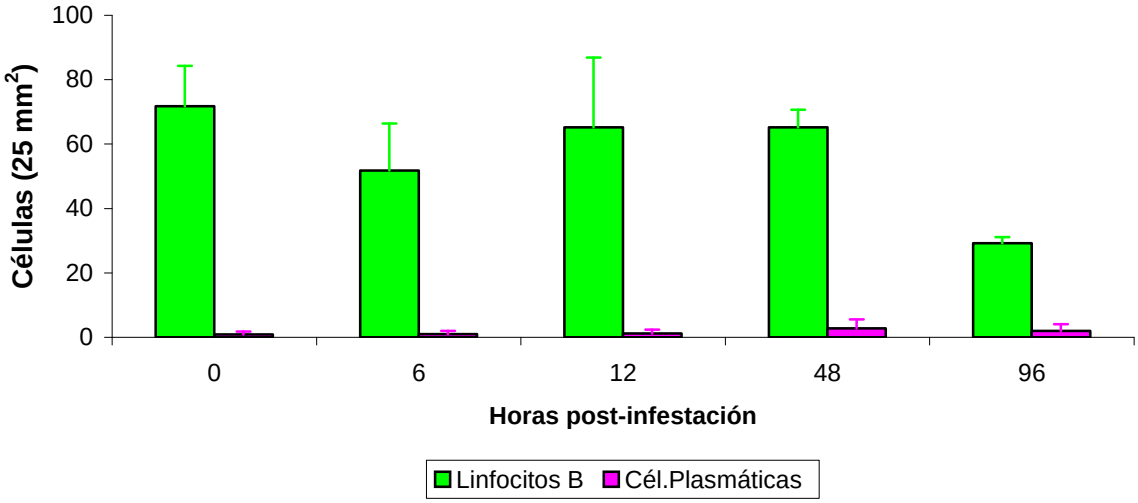


Figura 1.8.- Relación entre el número de linfocitos B y células plasmáticas a nivel dérmico en los animales testigo

En los **animales testigo** el número de células plasmáticas fue muy bajo y se mantuvo muy por debajo del de los linfocitos B a lo largo de todo el estudio.

Mediante el test de correlación de Pearson no se detectó una correlación entre linfocitos B y células plasmáticas en los animales testigo ($P > 0,05$).

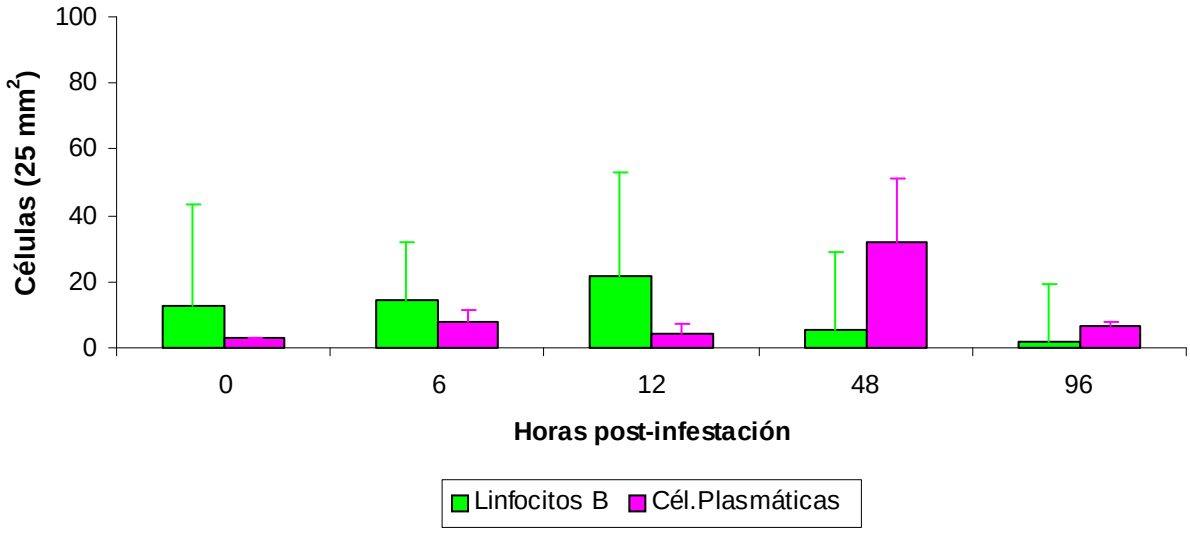


Figura 1.9.- Relación entre el número de linfocitos B y células plasmáticas a nivel dérmico en los animales primoinfestados

En los **animales primoinfestados** el número de linfocitos B se incrementó ligeramente hasta las 12 h.p.i. para a continuación descender hasta el final del estudio (Figura 1.9). El comportamiento de las células plasmáticas fue bastante similar, si bien sus poblaciones aumentaron considerablemente a las 48 h.p.i para volver a reducirse a las 96 h.p.i. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos indicar que la respuesta inmune humoral en los animales primoinfestados, representada por linfocitos B y células plasmáticas, fue moderada.

Mediante el test de correlación de Pearson sólo se detectó una correlación positiva entre linfocitos B y células plasmáticas a las 12 h.p.i. ($r= 0,982$; $P= 0,018$).

En las **vacas reinfestadas** el incremento de los linfocitos B se relacionó con un aumento de las células plasmáticas (Figura 1.10).

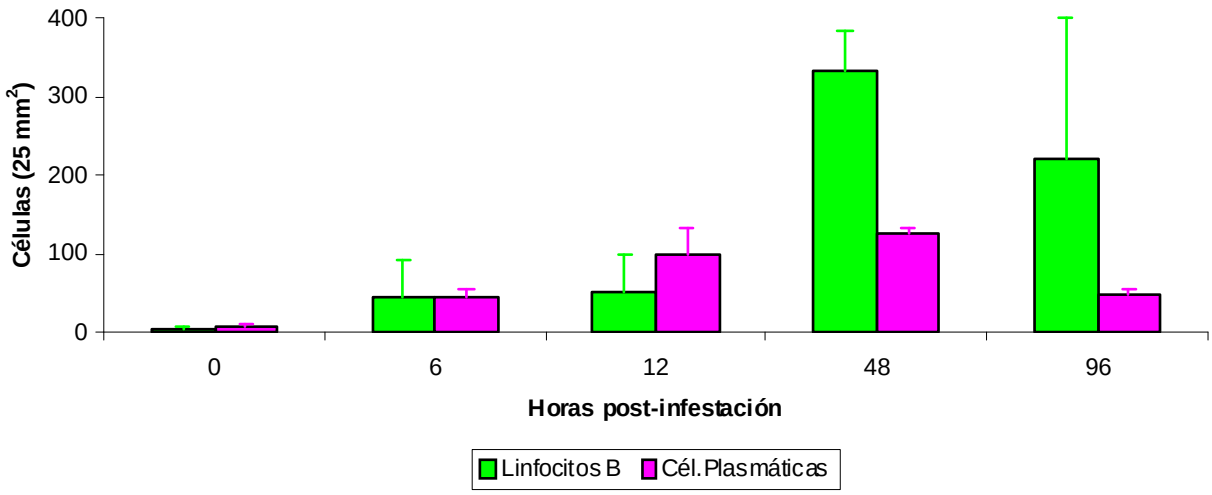


Figura 1.10.- Relación entre el número de linfocitos B y células plasmáticas a nivel dérmico en los animales reinfestados

No obstante, mediante el test de correlación de Pearson no se detectó una correlación entre ambos grupos celulares (P> 0,05).

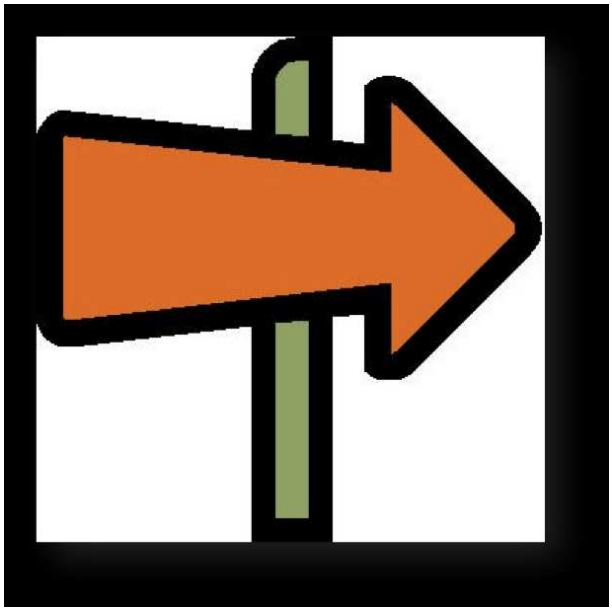
De esta forma se comprueba que los linfocitos B en los animales que ya han tenido una exposición previa al parásito, comienzan a elevarse desde el inicio de la infestación hasta las 48 h.p.i. y, en consecuencia, las células plasmáticas aumentan su número a partir de las 6 h.p.i. con cifras máximas a las 48 h.p.i.

Al comparar el comportamiento de la respuesta humoral al inicio de la infestación por *Hypoderma* en ambos grupos de animales, se observa que en el grupo reinfestado la elevación de los linfocitos B y células plasmáticas es simultáneo, con un máximo a las 48 h.p.i., mientras que en los primoinfestados, se produce en primer lugar la elevación de los linfocitos B (máx 12 h.p.i.) y posteriormente la de las células plasmáticas (máx. 48 h.p.i.). No obstante, tenemos que señalar que a pesar de estas elevaciones, los niveles séricos de anticuerpos específicos frente a *H. lineatum*, en esta fase tan temprana de la infestación, se mantuvieron en niveles negativos a lo largo de todo el estudio (datos no mostrados).

Kanobana y col. (2003) en terneros reinfectados con *Cooperia oncophora*, encuentran que las células plasmáticas y los linfocitos B marcados a nivel de las placas de Peyer son más abundantes que en los terneros infectados por primera vez. También comprueban que este aumento se corresponde con un nivel mayor de anticuerpos en el suero de los animales.

ENSAYO 2. RESPUESTA CELULAR CUTÁNEA Y PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN MUESTRAS CONGELADAS EN GANADO VACUNO INFESTADO EXPERIMENTALMENTE POR *Hypoderma lineatum*

4.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS



En la hipodermosis la resistencia adquirida comienza a desarrollarse a partir de la primera infestación del hospedador (Gingrich, 1980), pero no alcanza su máxima eficacia hasta la tercera o cuarta infestación, apreciándose una disminución, en algunos casos muy notable, del número de barros en el dorso del animal, así como una disminución de la viabilidad en relación con las anteriores parasitaciones (Gingrich 1982; Pruett y Barrett, 1985; Baron y Weintraub, 1987b).

Las citoquinas secretadas por las células epidérmicas y dérmicas y por los nódulos linfáticos locales son recogidas por los plexos vasculares de la dermis superficial y, distribuidas vía sistémica, sirviendo como una señal temprana ante la que responde el sistema inmune del hospedador (Salmon y col., 1994).

En este segundo ensayo nos propusimos estudiar, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, la respuesta celular local y la producción de citoquinas durante la fase de penetración larvaria en muestras de piel congeladas, y para ello nos planteamos los siguientes **objetivos específicos:**

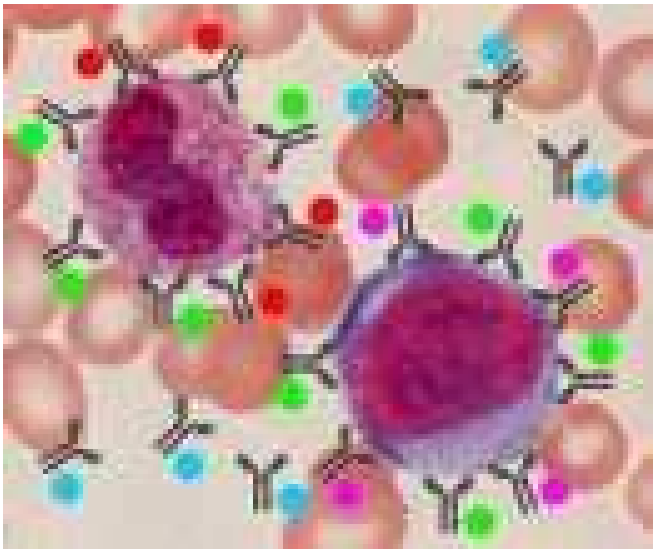
A) Examinar los cambios histopatológicos en la piel del ganado vacuno primoinfestado y reinfestado por primera y segunda vez con larvas 1 de *H. lineatum*, prestando especial atención a la respuesta eosinofílica.

B) Estudiar la respuesta y distribución de los linfocitos T (CD3+, CD4+, y CD8+), B (BAQ44A+), macrófagos y células MHC tipo II en el infiltrado inflamatorio de la piel de ganado vacuno primoinfestado y reinfestado por primera y segunda vez, durante los 6 días siguientes a la infestación.

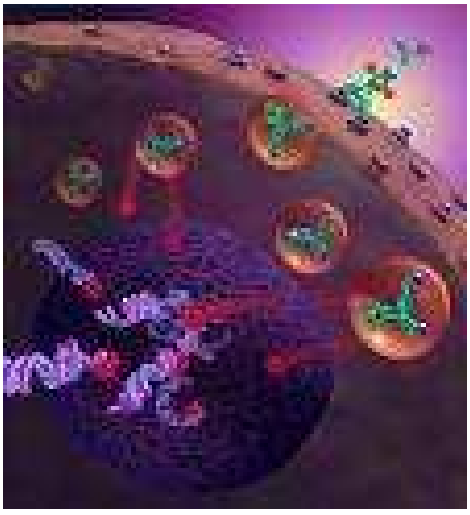
C) Cuantificar el número de células productoras de citoquinas: factor de necrosis tumoral (TNF-α), interferón gamma (IFN-γ), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 10 (IL-10) e interleuquina 12 (IL-12) a nivel cutáneo en animales infestados experimentalmente con *H. lineatum*.

D) Determinar los niveles séricos de citoquinas (TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-12) durante las fases iniciales de la infestación por *H. lineatum*.

E) Establecer una relación entre la producción de citoquinas en el punto de penetración larvaria y a nivel sistémico en los bovinos infestados experimentalmente por *H. lineatum*.



4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS



4.2.1.- ANIMALES E INFESTACIONES EXPERIMENTALES

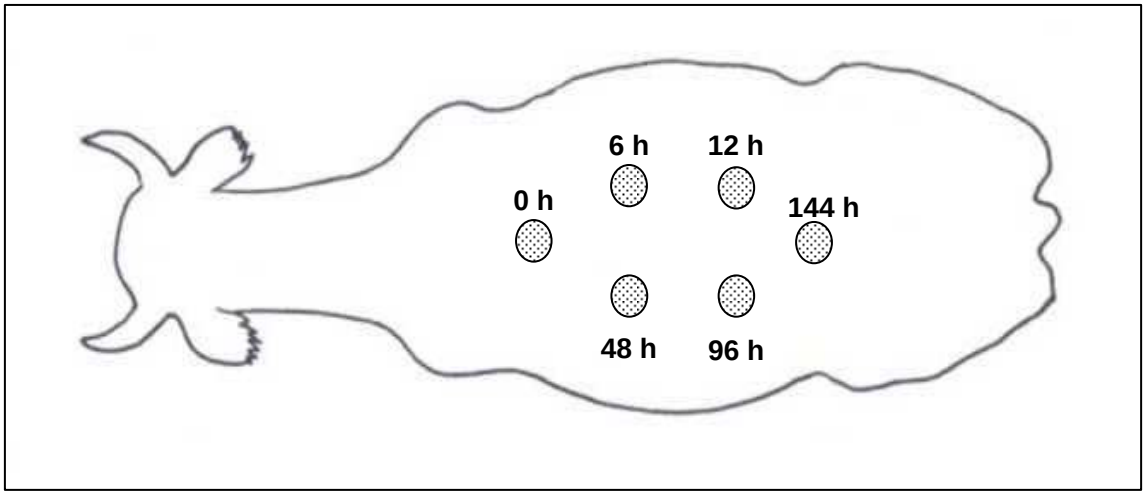
En la realización del presente estudio, se emplearon 3 grupos de animales integrados por 4 vacas de raza Holstein. Todos los animales estaban libres de parásitos y no se apreciaron problemas infecciosos, tal como indicaron los análisis de heces y la consiguiente ausencia de signos clínicos.

- El primer grupo (G-1), se infestó experimentalmente con una media de 10 L-1 en cada punto, actuando como **primoinfestado**.

- El segundo grupo (G-2), estaba formado por 4 vacas que ya habían sido infestadas el año anterior y que constituyeron el grupo **reinfestado por primera vez** con una media de 10 L-1 *Hypoderma lineatum* en cada lugar.

- El grupo 3 (G-3) estaba constituido por animales **reinfestados por segunda vez** consecutiva por *H. lineatum.*

La infestación de los animales se realizó con larvas 1 de *Hypoderma lineatum* obtenidas de acuerdo con el protocolo de Colwell (2001) ya descrito en el ensayo 1. De esta forma, una vez obtenidas todas las larvas necesarias para el estudio, se infestaron todos los animales de los grupos 1, 2 y 3 con aproximadamente 10 L-1 recién eclosionadas en cada uno de los 6 puntos de la piel del dorso. La infestación se llevó a cabo de acuerdo con el esquema 2.1.



Esquema 2.1.- Distribución de los puntos en los que se llevó a cabo la infestación experimental y la toma de muestras

Posteriormente, se observaron durante un tiempo para confirmar su penetración a través de la piel.

Durante la infestación y los siguientes 6 días, los animales se mantuvieron en el Centro de Investigaciones de Lethbridge (Alberta, Canadá), sujetos por colleras para evitar el lamido o rascado, donde permanecieron en cubículos individuales con una temperatura de 15ºC y con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Al final del estudio (6º día postinfestación), todos los animales se trataron con 0,5 mg/k.p.v.de moxidectina “pour-on” (Cydectin®, Ford Dodge Veterinaria).

4.2.2.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

De cada animal se tomaron muestras de sangre y piel a las 0, 6, 12, 48, 96 y 144 horas post-infestación. Las muestras de piel se tomaron siguiendo la técnica empleada en el ensayo 1.

La sangre se extrajo de la vena caudal en tubos de vidrio Vacutainer de 10 ml, estériles y cerrados al vacío. Seguidamente se dejaron reposar a temperatura

ambiente durante varias horas, tras lo cual se colocaron en el frigorífico a 4 ºC para facilitar la retracción del coágulo. El suero se congeló a -20ºC hasta su posterior empleo.

Las biopsias de piel se orientaron de modo que en los cortes se incluyera todo el espesor de la piel; a continuación embebieron en Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) y se enfriaron rápidamente en isopentano previamente enfriado en nitrógeno líquido y, finalmente se almacenaron a -80ºC.

Los cortes tisulares, de 7 µm de grosor, se realizaron en criostato (Microm HM 500) a temperatura de -16ºC y se colocaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina, para evitar su posterior desprendimiento. Por último, se fijaron en acetona durante 10 minutos y se conservaron a -80ºC hasta su uso.

Los sueros de referencia empleados para la puesta a punto de los test ELISA procedían de una población de sueros positivos obtenidos de vacas que con anterioridad habían presentado nódulos larvarios en el dorso, y de una población de sueros negativos, procedentes de animales que nunca habían salido al pasto.

4.2.3.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Tras la descongelación y secado de los cortes, la tinción elegida para realizar el estudio histológico fue la de Hematoxilina-Eosina y se realizó siguiendo el protocolo descrito en la tabla 2.1.

El sellado de las muestras se realizó aplicando una gota de medio de montaje rápido (DPX®) sobre el cubreobjetos y colocando sobre él con cuidado el portaobjetos con la muestra. Finalmente, se eliminaron las burbujas de aire que pudieran quedar y se dejó secar 24h antes de examinarlas al microscopio.

Para realizar el recuento de los eosinófilos se observaron 25 áreas de la dermis superficial, profunda e hipodermis a 500 aumentos, constituyendo el área de recuento.

Tabla 2.1.- Técnica de tinción Hematoxilina-eosina para muestras congeladas

Varios lavados con agua corriente

Tinción

- Hematoxilina durante 5 minutos

Varios lavados con agua corriente

- Carbonato de litio durante 10 segundos

Contraste

- Eosina durante 3 minutos

Varios lavados con agua corriente

Deshidratación de las muestras

- Etanol 50º durante 1 minuto
- Etanol 70º durante 1 minuto
- Etanol 96º I durante 1 minuto
- Etanol 96º II durante 1 minuto
- Etanol 100º I durante 3 minutos
- Etanol 100º II durante 3 minutos
- Xilol I durante 5 minutos
- Xilol II durante 5 minutos

4.2.4.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El material utilizado en la toma y procesado de muestras, realización de cortes histológicos y técnicas inmunohistoquímicas, fue muy similar al empleado en la Tabla 1.3 del ensayo 1.

Los anticuerpos primarios específicos usados para determinar las poblaciones celulares en las muestras congeladas fueron los siguientes:

	Anticuerpo/Clon	Origen	Dilución	
CD3 (Humano)	Policlonal	Conejo	1:100, 1:200 y **1:300**	Dako
CD4 (Bovino)	CC8*	Ratón	1:50, **1:100** y 1:200	Serotec
CD8 (Bovino)	GM01*	Ratón	1:50, **1:100** y 1:200	VMRD
IgM (μ-heavy chain Humano)	BAQ44A^{+}*	Ratón	1:50 ,1:100 y **1:200**	VMRD
MHC tipo II (Oveja)	VPM36*	Ratón	**1:50** y 1:100	Dako
Macrófagos (Myeloid/Histiocyte Antigen Bovine)	MAC387*	Ratón	**1:50 y** 1:100	Dako

Después de estudiar las diferentes diluciones, las que mostraron mejores resultados se obtuveron: para los CD3 con la dilución 1:300 al igual que en el ensayo 1, para CD4 y CD8 con la 1:100, para los linfocitos B la 1:200 y, finalmente, para el complejo principal de histocompatibilidad y para los macrófagos, la de 1:50.

Para la detección de las diferentes interleuquinas se emplearon los siguientes anticuerpos primarios:

	Anticuerpo/Clon	Origen	Dilución	
TNF-α (Bovino)	CC327*	Ratón	**1:50** y 1:100	Serotec
IFN-γ (Bovino)	CC330*	Ratón	**1:50** y 1:100	Serotec
IL-4 (Bovino)	CC313*	Ratón	**1:50** y 1:100	Serotec
IL-10 (Bovino)	CC318*	Ratón	**1:50** y 1:100	Serotec
IL-12 (Bovino)	CC301*	Ratón	**1:50** y 1:100	Serotec

Para todas las interleuquinas la dilución óptima fue la de 1:50, ya que al usar una dilución mayor las células se marcaban más débilmente e incluso dejaban de mostrarse.

La técnica inmunohistoquímica empeada fue la de Avidina-biotina-peroxidasa (ABC), aunque con algunas modificaciones respecto al protocolo visto en el primer ensayo que se muestran a continuación:

Tabla 2.2: Técnica inmunohistoquímica para muestras congeladas

1. **Secado:** se sacan los cortes histológicos del congelador (-80ºC) y se introducen en la estufa a 37ºC durante 1 hora
2. **3 lavados en TBS** de 10 minutos cada uno
3. **Inhibición de la peroxidasa endógena**: un baño en una solución de peróxido de hidrógeno al 6% en metanol durante 30 minutos
4. **3 lavados en TBS** durante 5 minutos cada uno
5. **Bloqueo de las reacciones inespecíficas**: se incuba en cámara húmeda con suero normal de cabra al 5% en TBS (30 minutos a temperatura ambiente)
6. **Anticuerpo primario**: se elimina el exceso de suero normal de cabra y se incuba 12 horas a 4ºC en cámara húmeda con el anticuerpo primario diluido en TBS y suero normal de cabra al 5% y posteriormente se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente
7. **2 lavados en TBS** de 10 minutos cada uno
8. **Anticuerpo secundario biotinilado**: los cortes histológicos se incuban 30 minutos a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario diluido en TBS y suero normal de cabra al 5%
9. **3 lavados en TBS** de 10 minutos cada uno
10. **Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC)**: incubación durante 1 hora en oscuridad con el complejo ABC diluido al 1:50 en TBS
11. **3 lavados en TBS** de 10 minutos cada uno
12. **Revelado**: la reacción fue revelada mediante un pase de 1 minuto en una solución fresca de diaminobencidina (DAB) al 0,035% en TBS con peróxido de hidrógeno al 0,1%, sobre fondo blanco
13. **Frenado del revelado**: lavado en agua corriente durante 10 minutos.

14. **Contratinción con hematoxilina**: 1 minuto
15. **Lavado**: 3 minutos en agua corriente
16. **Deshidratación**: mediante pases rápidos por gradientes alcohólicos
17. **Montaje de las preparaciones**. aplicando una gota de DPX® al cubreobjetos y dejando caer suavemente el portaobjetos

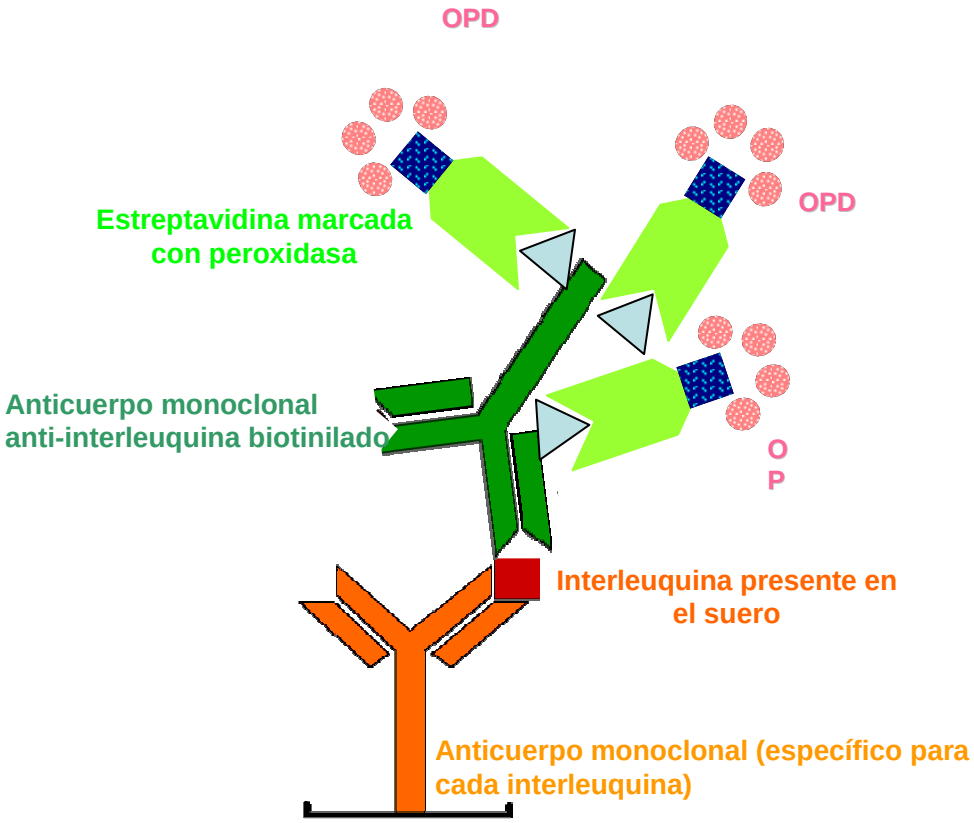
Finalmente, para realizar los recuentos celulares se llevó a cabo una observación previa a 200 aumentos de toda la muestra. Posteriormente, se realizó el recuento a 500 aumentos sobre 25 campos distribuidos por toda la superficie de la muestra ya que las poblaciones celulares no se localizaban de forma uniforme en las distintas capas de la piel. Por lo tanto, los resultados se muestran como número de células marcadas en 25 campos (células/área de recuento).

Para cada uno de los distintos anticuerpos se realizó un estudio cuantitativo y se observó su distribución en las distintas capas dérmicas: epidermis, dermis superficial, dermis profunda e hipodermis.

Los controles empleados para los tejidos congelados fueron los mismos que los empleados en el ensayo 1.

4.2.5.- TÉCNICA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE INTERLEUQUINAS EN SUERO

Para detectar las diferentes citoquinas circulantes se empleó un ELISA sándwich que se detalla a continuación (Esquema 2.2).



Esquema 2.2.- Diseño del ELISA sándwich o de captura

1. Sensibilización de las placas de microtitulación con el primer anticuerpo (monoclonal): Los anticuerpos primarios ensayados fueron los mismos que se emplearon en el estudio inmunohistoquímico.

Una vez elegida la dilución que ofrecía los mejores resultados, se procedió a sensibilizar placas de fondo plano (Nunc Maxisorb) con el anticuerpo monoclonal, a una concentración de 0,1 mg ml^{-1} en tampón fosfato (PBS, pH 7,2). A continuación se bloquearon los puntos de unión inespecíficos durante 1 hora en agitación y a una

temperatura de 20ºC con 400 µl de PBS al que se le había añadido Tween 20 al 0,3% y seroalbúmina bovina (BSA) al 3% (tampón de dilución).

2. Adición de los sueros problema: Las muestras de suero problema, así como los sueros testigo positivo y negativo, se dispensaron a una dilución 1:1 en BSA y se depositaron 100 µl/pocillo. Cada suero se ensayó por duplicado y se consideró la media de ambos valores. De la misma forma se dispensaron los controles positivo y negativo. Para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo específicos, la placa se incubó de nuevo, en agitación durante 1 hora a una temperatura de 20ºC; transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con 100 µl de PT (PBS + Tween 20).

Los sueros de referencia empleados para la puesta a punto de los test ELISA para cada una de las interleuquinas estudiadas procedían de una población de sueros positivos obtenidos de vacas que con anterioridad habían presentado nódulos larvarios en el dorso, las cuales mostraban títulos elevados para cada interleuquina, y de una población de sueros negativos, procedentes de animales jóvenes que nunca habían salido al pasto y que presentaban niveles bajos para cada interleuquina.

3. Segundo anticuerpo (monoclonal): El anticuerpo monoclonal de bovino anti-interleuquina estaba marcado con biotina para amplificar la reacción. Este anticuerpo se empleó a la dilución 1:1000 dispensando 100 µl/pocillo Tras incubar las placas durante 1 hora a 20ºC, se lavó 4 veces con PT.

Los anticuerpos usados en este caso fueron:

	Anticuerpo/Clon	Origen	Dilución	
TNF-α (Bovino)	CC328*	Ratón	1:1000	Serotec
IFN-γ (Bovino)	CC302*	Ratón	1:1000	Serotec
IL-4 (Bovino)	CC314*	Ratón	1:1000	Serotec
IL-10 (Bovino)	CC320*	Ratón	1:1000	Serotec
IL-12 (Bovino)	CC326*	Ratón	1:1000	Serotec

* Anticuerpos monoclonales

4. Inmunoconjugado: se empleó la estreptavidina marcada con peroxidasa

(Streptavidin-Peroxidase Polymer, Sigma). Este conjugado se diluyó 1/1000 en BSA al 3% y después de depositar 100 µl en cada pocillo, se incubaron las placas durante 45 minutos a 20ºC. A continuación se lavaron 3 veces con PT y finalmente 2 veces más con 100 µl de PBS.

5. Revelado de la reacción: para valorar la actividad de la enzima peroxidasa empleamos OPD (ortofenilendiamina, Sigma). La dilución del substrato se realizó en tampón citrato (pH 5) y agua oxigenada al 30%. Se depositaron 100 µl de esta dilución en cada pocillo y las placas se colocaron en un lugar oscuro durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 3N a cada pocillo. Posteriormente, las placas se dejaron en reposo, durante 5-10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La lectura de las densidades ópticas se realizó en un espectrofotómetro modelo 680 de Bio Rad y con un filtro de 490 y 450 nanómetros.

4.2.6.- NORMALIZACIÓN DE LAS ABSORBANCIAS Y CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES

La normalización o estandarización de las absorbancias (DO) se llevó a cabo del modo siguiente:

A.- Normalización de una placa: se resta la media de los valores de la DO de los pocillos empleados como blanco al resto de los pocillos de dicha placa.

B.- Normalización de todas las placas: se halla la media entre las absorbancias de los sueros testigo positivo y negativo de cada una de las placas y a continuación se calcula el valor medio de todas las placas en conjunto.

C.- Factor de normalización de cada placa: se obtiene dividiendo el valor medio de cada placa entre el valor medio total. Para poder normalizar las absorbancias de cada pocillo se divide el valor de su DO por su correspondiente factor de normalización de placa.

Una vez normalizadas las absorbancias, se calcularon las concentraciones (ng ml^{-1}) de las distintas citoquinas en el suero, para ello se usaron curvas cuadráticas obtenidas con concentraciones conocidas de las distintas interleuquinas recombinantes de ganado bovino (rboIL-4, rboIFN-γ y rboTNF-α todas ellas de Serotec) que actuaron como patrón.

En el caso de la IL-10 e IL-12, al no disponer de la interleuquina recombinante de bovino para emplear como patrón, los resultados se expresaron como valores normalizados de densidad óptica (450 nm).

4.2.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 17.0.1. SPSS Inc, Chicago (1995).

El análisis estadístico comprendió la determinación de los parámetros descriptivos, media y desviación estándar, de las variables valoradas tanto en el estudio histopatológico (eosinófilos) como inmunohistoquímico (linfocitos T, B, CD4, CD8, macrófagos, etc.). La determinación de los valores de cada animal se obtuvo a partir de la observación de 25 campos distribuidos entre la dermis superficial, profunda y la hipodermis.

La evolución de las distintas poblaciones celulares y citoquinas en los distintos grupos a lo largo del tiempo, se analizó mediante la prueba de análisis de varianza de muestras repetidas, empleando el contraste de Diferencia para comprobar si en las sucesivas muestras había diferencias significativas con respecto a la media de las muestras previas. Se empleó el contraste simple para detectar diferencias entre los distintos grupos de animales.

La correlación entre distintos tipos celulares (CD4/CD8) y entre los niveles locales y sistémicos de las distintas citoquinas se llevó a cabo mediante el test de correlación de Pearson.

4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1.- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En este ensayo los grupos de animales fueron distintos a los del ensayo 1, así hemos introducido un grupo reinfestado por segunda vez, para ver qué sucede una vez que la respuesta protectora está más desarrollada en el hospedador y, la toma de muestras se ha alargado hasta las 144 horas post-infestación (6 d.p.i.) para poder evaluar el comportamiento de la respuesta celular cutánea una vez que las larvas 1 de *H. lineatum* ya han abandonado la piel y emprendido su migración hacia el esófago.

4.3.1.1.- VALORACIÓN DE LOS INFILTRADOS LINFOPLASMOCITARIOS

Al igual que en el ensayo 1, en el **grupo primoinfestado** la epidermis presentaba una estructura típica sin ninguna lesión aparente, aunque ocasionalmente estaba ligeramente engrosada. En la dermis superficial se observó una ligera reacción en la piel entre las 6 y 96 h.p.i., de modo que a las 48 h.p.i. se encontró un infiltrado inflamatorio moderado en la dermis superficial compuesto por células mononucleares y, ocasionalmente, por polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. A las 144 h.p.i. la reacción inflamatoria en esta capa era muy poco evidente. Tenemos que destacar que un animal de este grupo presentó a lo largo de todo el estudio edema en la dermis superficial, con la participación de abundantes linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos. La distribución de las diferentes poblaciones celulares en esta capa era fundamentalmente perivascular, si bien, de forma ocasional, se observaron agregados en torno a los folículos pilosos.

En la dermis profunda de estos animales no se observó ninguna alteración destacable. En cuanto a la hipodermis, hay que señalar que ésta no siempre estaba presente en las muestras; ya que en ocasiones se perdía durante el procesado de los cortes, no obstante la reacción inflamatoria era bastante reducida y cuando estaba presente se distribuía en la transición entre dermis profunda e hipodermis.

En los animales del **grupo reinfestado por 1ª vez** hubo una mayor variabilidad en la respuesta con respecto a los primoinfestados. En la epidermis de la mayor parte de los animales se observaron engrosamientos, escaras y ocasionalmente alguna vesícula siendo más frecuentes entre las 6 y 96 h.p.i. La dermis superficial de estos animales presentaba una mayor reacción inflamatoria agrupada de forma perivascular

y ocasionalmente alrededor de los folículos pilosos de igual forma que sucedía en el grupo anterior. El infiltrado inflamatorio estaba compuesto fundamentalmente por eosinófilos, células mononucleares y polimorfonucleares neutrófilos. Cabe destacar un mayor predominio de las células linfocitarias con respecto a los primoinfestados, cuyo acúmulo se producía a partir de las 12 h.p.i. alcanzándose el nivel máximo entre las 48-96 h.p.i. Al igual que en el grupo anterior, en la dermis profunda no se observó ninguna alteración estando constituida por una estructura típica de fibras reticulares de colágeno.

Finalmente, en la hipodermis la reacción inflamatoria fue más intensa observándose no sólo la parte superior, como ocurría en el grupo anterior, sino en toda la capa. Destacó un predominio de las células linfocitarias mientras que los eosinófilos estaban menos representados. La distribución celular, al igual que en los casos anteriores, era claramente perivascular siendo especialmente abundantes entre las 48 y 96 h.p.i.

Por último, los animales **reinfestados por segunda vez** presentaron una reacción más intensa en todas las capas cutáneas. En la epidermis se observaron soluciones de continuidad con engrosamientos pronunciados, así como un mayor número de vesículas y escaras. Ocasionalmente, se encontraron acúmulos celulares inmediatamente por debajo de esta capa que se mantuvieron constantes a lo largo del estudio. Estas poblaciones celulares estaban formadas fundamentalmente por células linfocitarias y eosinófilos.

La dermis superficial de estas vacas se encontraba muy alterada con una importante reacción inflamatoria en el lugar de penetración de las larvas desde el comienzo del estudio. Así, a las 6 h.p.i. ya pudo observarse un infiltrado perivascular moderado, compuesto principalmente por células mononucleares, eosinófilos y neutrófilos. A partir de las 12 h.p.i la reacción cutánea se incrementó considerablemente con infiltrados inflamatorios perivasculares en los que podían observarse numerosas células mononucleares y eosinófilos. Finalmente, a partir de las 96 horas post-infestación, la reacción inflamatoria se redujo considerablemente. Podemos destacar la presencia de edema en varios animales de este grupo, especialmente a las 48-96 h.p.i. En este caso la dermis profunda también presentó una reacción inflamatoria distribuida de forma perivascular entre las fibras de colágeno.

Por último, la hipodermis de estos animales presentaba una reacción inflamatoria más intensa que en los animales reinfestados una sola vez con un infiltrado en el que predominaban los eosinófilos y en menor medida las células linfocitarias. La distribución de éstas era nuevamente perivascular y la mayor proporción se encontraba a las 48-96 horas post-infestación (Foto 12).

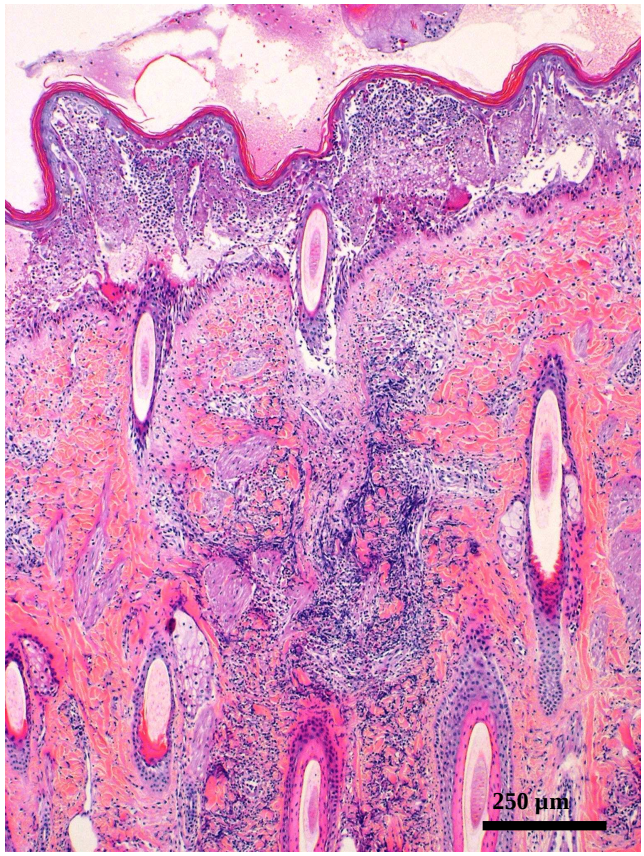


Foto 12.- Infiltrado perivascular en animales reinfestados por segunda vez

La importancia de esta respuesta celular cutánea en el desarrollo del ciclo de *Hypoderma* había sido señalada en los estudios de Nelson y Weintraub (1972), quienes comprobaron que al suprimir la reacción cutánea de base celular en bovinos previamente infestados, mediante la administración de ACTH, aumentaba de forma significativa el número de larvas que lograban superar la barrera cutánea. De acuerdo con diversos autores (Gingrich, 1982; Pruett y Barrett, 1985; Baron y Weintraub, 1987), esta resistencia adquirida se inicia a partir de la primera infestación y no alcanza su máxima eficacia hasta la tercera o cuarta, apreciándose una reducción, en algunos casos muy importante, del número de nódulos larvarios en el dorso de los animales, así como menor viabilidad de las L-3 en relación con anteriores parasitaciones.

La escasa respuesta en los animales primoinfestados se correlaciona con la baja respuesta linfoproliferativa observada por Baron y Weintraub (1987) y por Fisher y col. (1991) en animales primoinfestados y con la degradación del componente C3 que inhibe la ruta del complemento y que impide, por lo tanto las respuestas inflamatorias e inmunitarias frente al parásito (Boulard, 1989; Baron, 1990). Estas observaciones nos permiten deducir que las larvas de *Hypoderma* son capaces de sobrevivir en ganado no infestado previamente ya que son capaces de inhibir la respuesta celular.

En este ensayo hemos comprobado como la respuesta inflamatoria en los animales reinfestados por 2ª vez supera a la de los reinfestados por 1ª vez, de modo que podemos concluir que la intensidad de la respuesta aumenta tras varios contactos sucesivos con el parásito. Ya en 1924, Hawden y Fulton observaron en animales reinfestados por *Hypoderma* fuertes reacciones edematosas alrededor de las L-1, con un exudado seroso que aglutinaba los pelos alrededor de los puntos de penetración. Según estos mismos autores, en ocasiones, sobre todo en animales de piel clara, pueden observarse zonas petequiales próximas a la raíz de los pelos; microscópicamente, observaron un infiltrado de células inflamatorias, eosinófilos y restos de fibras de colágeno. Simmons (1937) señaló la presencia de puntos necróticos, irritación, inflamación, costras epidérmicas y erizamiento del pelo en bovinos muy sensibilizados, destacando la escasez de neutrófilos en zonas próximas a las larvas. Estos resultados contrastan con los nuestros, en los que en los animales reinfestados se encontró un importante número de neutrófilos alrededor de las lesiones.

En la epidermis de los animales reinfestados por L-1 de *Hypoderma lineatum* se encontraron vesículas que fueron más abundantes en los reinfestados por 2ª vez. Van den Broek y col. (2004) también hallaron vesículas de forma ocasional en ovejas infestadas por *Psoroptes ovis* que estaban formadas por un líquido rico en proteínas con pocas células.

4.3.1.2.- RESPUESTA EOSINOFÍLICA

Al estudiar la respuesta eosinofílica en el **grupo primoinfestado** se observó que el número de eosinófilos fue reducido a lo largo de todo el estudio (Figura 2.1) con un nivel máximo a las 96 h.p.i que no sobrepasó los 42,0±24,51 eosinófilos/área. Esta ausencia de cambios significativos en los animales primoinfestados coincide con los resultados obtenidos en el ensayo 1. Por el contrario, el **grupo reinfestado por primera vez** mostró un aumento continuo desde las 12 h.p.i. (176,2±79,02 eosinófilos/área) con un descenso final a partir de las 96 h.p.i. Estas células se encontraban fundamentalmente alrededor de los plexos vasculares de la dermis superficial y profunda (Foto 13).

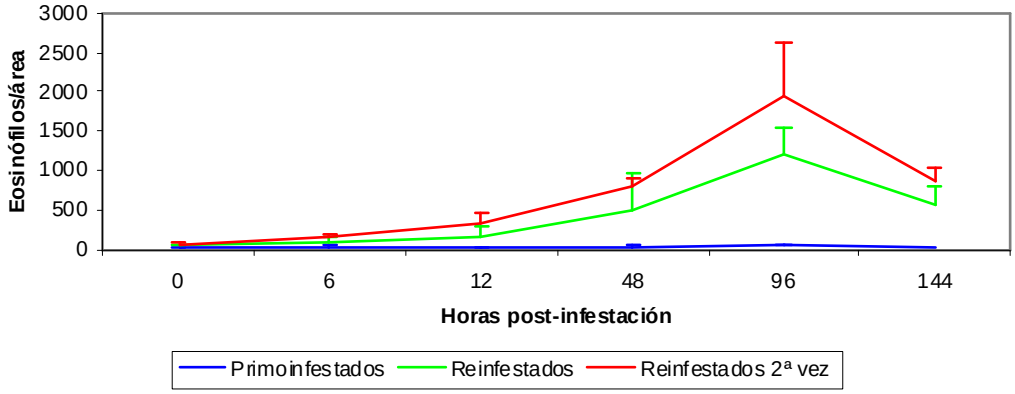


Figura 2.1.- Evolución de los eosinófilos a nivel dérmico en los tres grupos de animales

El test ANOVA de muestras repetidas mostró cambios significativos en el número de eosinófilos de los diferentes grupos a lo largo del estudio (Prueba de Wilks: *F*= 6,492; *P*= 0,003). Entre los diferentes grupos mediante el contrate simple se hallaron diferencias a las 6 h.p.i. (*F*= 4,411; *P*= 0,046), 48 (*F*= 14,647; *P*= 0,001), 96 (*F*= 17,315; *P*= 0,01) y a las 144 h.p.i. (*F*= 13,570; *P*= 0,002). Mediante la prueba de Bonferroni se hallaron diferencias entre los animales primo y reinfestados por segunda vez a las 6, 12, 48, 96 y 144 h.p.i. Esta prueba también indicó diferencias entre los primo y reinfestados, pero en este caso solamente a las 48, 96 y 144 h.p.i. Por otra parte, el contraste de diferencia indicó que el grupo primoinfestado mostraba un incremento significativo a las 6 h.p.i (*F*= 12,218; *P*= 0,040) y a las 96 h.p.i. (*F*= 26,286; *P*= 0,014) y en los animales reinfestados por primera vez estas diferencias se encontraron a las 6 h.p.i. (*F*= 10,159; *P*= 0,050), 48 h.p.i. (*F*= 11,993; *P*= 0,041 y a las

96 h.p.i. (*F*= 106,717; *P*= 0,002). Finalmente, en el grupo de animales reinfestados por segunda vez se detectaron aumentos significativos en el número de eosinófilos a las 48 h.p.i. (*F*= 69,444; *P*= 0,004) y 96 h.p.i. (*F*= 25,3033; *P*= 0,015), y a las 144 h.p.i. (*F*= 3925,759; *P*< 0,001).

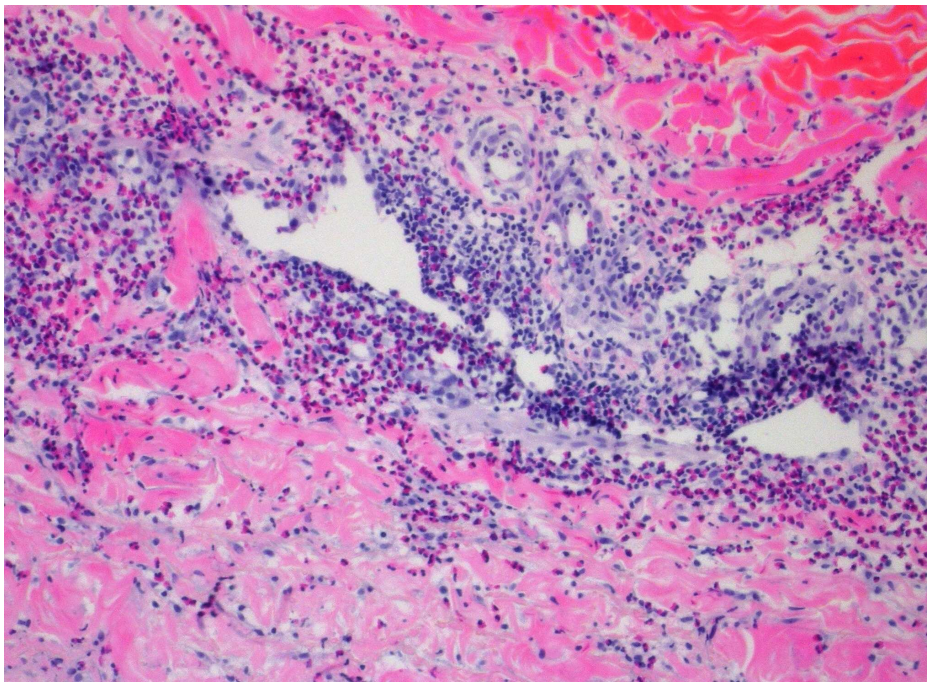


Foto 13.- Infiltrado inflamatorio perivascular en el que se observan abundantes eosinófilos

Estos resultados nos indican que, cuando los animales están sensibilizados por infestaciones anteriores, la respuesta cutánea es mucho más intensa, con infiltrados que ya eran visibles a las 6 h.p.i. Este hecho confirma los resultados de Nelson y Weintraub (1972) y Colwell (1989), quienes observaron un importante incremento de los eosinófilos circulantes e infiltraciones densas de estas células en la piel de los animales reinfestados por *H. lineatum*, lo que indicaría una respuesta anafiláctica importante.

A partir de las 96 h.p.i., es decir una vez que las larvas han completado su paso a través de la piel y ya han comenzado a migrar hacia la submucosa esofágica el número de eosinófilos en la piel disminuyó considerablemente. Estos intensos infiltrados eosinofílicos también fueron encontrados por otros autores a lo largo de la migración de las L-1 hacia los lugares de reposo (Boulard, 1975; Panciera y col., 1993). Una vez en la submucosa esofágica, este infiltrado eosinofílico se vuelve a apreciar tal

como indican Arru y col. (1985) y López y col. (1999a). Finalmente, cuando alcanzan el dorso del animal, López y col. (1999b) observaron trayectos longitudinales con restos de tejido necrosado acompañados de reacción inflamatoria con infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares eosinófilos.

La importancia de la respuesta eosinofílica también fue puesta de manifiesto por Duranton y col. (1997) en la infestación por *O. ovis*, quienes comprobaron que la degranulación de los eosinófilos provocaba la rápida mortalidad de las larvas de primer estadio.

En cuanto a la típica distribución perivascular, nuestros resultados difieren de los hallados por van den Broek y col. (2004), quienes observaron en ovejas infestadas por *Psoroptes*, áreas focales de infiltración eosinofílica que se extendían con frecuencia hasta la base de los folículos pilosos, excepto en la dermis profunda donde esta infiltración era escasa.

4.3.2.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.3.2.1.- LINFOCITOS T

En este ensayo se estudió la población de linfocitos que expresaban en su superficie el receptor $CD3^+$ y dentro de esta población se diferenciaron los linfocitos colaboradores, los cuales expresan en su superficie el receptor CD4 y los linfocitos citotóxicos que expresan el receptor CD8.

En la figura 2.2 observamos que los tres grupos de animales presentaron niveles similares de linfocitos T a lo largo del estudio.

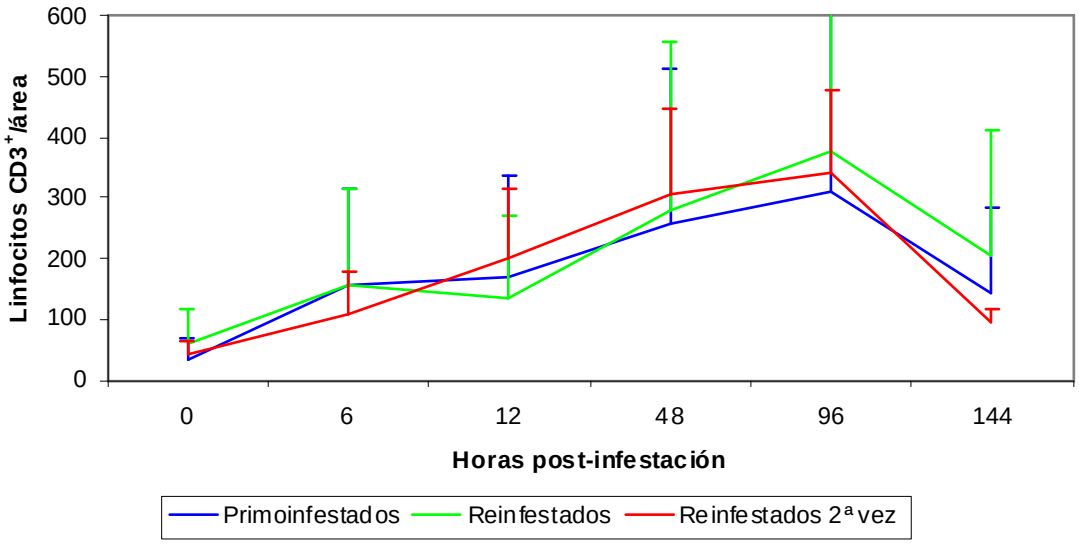


Figura 2.2.- Evolución del número de linfocitos T $CD3^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados** el número de células T fue moderado, oscilando entre los 34,8±12,69 al principio de la infestación (0 h.p.i.) y un número máximo a las 96 h.p.i. (309,3±116,96). En la última toma de muestras, el número medio descendió considerablemente hasta 143±23,57.

Los **animales reinfestados por primera vez** presentaron un comportamiento muy similar con un incremento desde el inicio de la infestación (58,5±37,42 linfocitos T/área) hasta las 96 h.p.i. con un número medio de 378,8±327,37 linfocitos T/área. En

este grupo, al igual que sucedía en el anterior, en la última toma de muestras su número medio descendió considerablemente.

Por último en los **animales reinfestados por segunda vez** se constató un comportamiento muy similar al grupo anterior, con un nivel máximo a las 96 h.p.i para descender sustancialmente al sexto día post-infestación (Foto 14).

La prueba de contraste de Diferencia mostró un aumento significativo en los animales primoinfestados a las 96 h.p.i. (F= 33,383; P= 0,010), mientras que en los reinfestados se produjo a las 6 h.p.i. (F= 28,124; P= 0,013). Finalmente en los animales reinfestados por segunda vez, se hallaron diferencias con respecto a los muestreos previos a las 48 h.p.i (F= 16,332; P= 0,027) y a las 96 h.p.i (F= 25,336; P= 0,015).

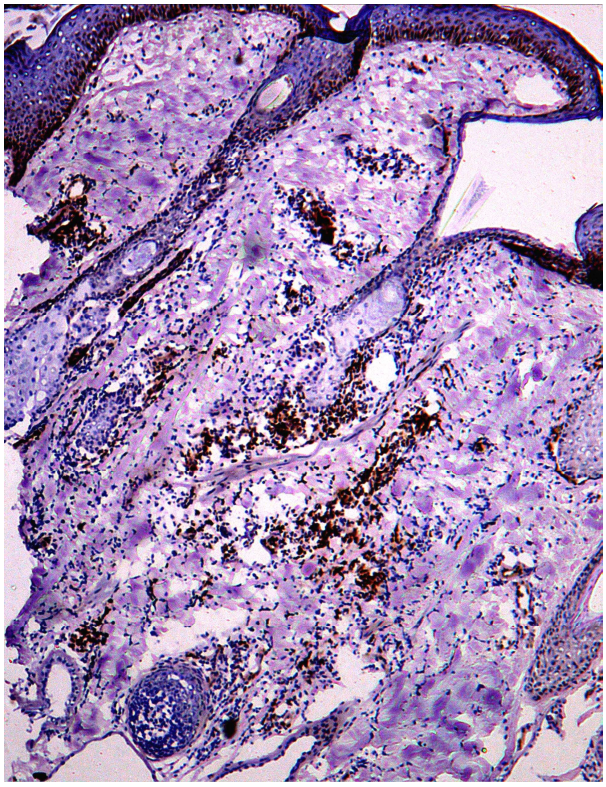


Foto 14.- Población de linfocitos T $CD3^+$ en la dermis superficial y profunda de los animales reinfestados por segunda vez

Al comparar la prueba de contraste Simple el número de células $CD3^+$ en los tres grupos de animales no se observaron diferencias significativas.

Respecto a la localización, en los tres grupos de animales las células positivas se distribuían rodeando los vasos sanguíneos y se hallaban fundamentalmente en la dermis superficial y profunda, siendo su número muy escaso en la hipodermis (Foto 15).

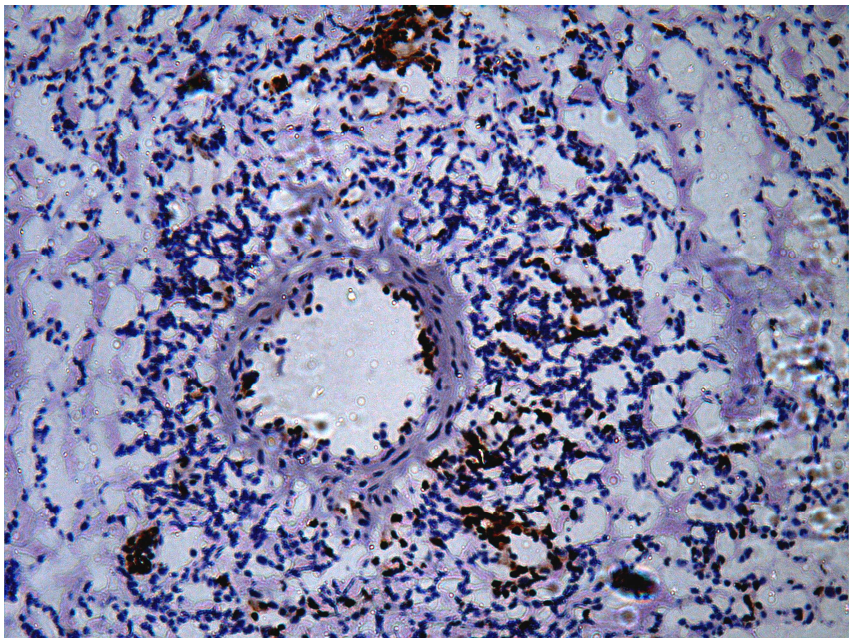


Foto 15.- Población de linfocitos T $CD3^+$ distribuidos perivascularmente en la dermis profunda de los animales reinfestados

El incremento rápido de las células linfocitarias también fue observado por Elhay y col. (1994) y Bowles y col. (1994) en ovejas infestadas por *Lucilia cuprina*. Estos últimos autores observaron como este incremento se producía tanto en los animales primoinfestados como reinfestados y al igual que en nuestro estudio se producía de forma más precoz en estos últimos.

En nuestro estudio llama la atención el descenso del número de linfocitos, sobre todo en los reinfestados por 2ª vez, a los 6 d.p.i. (144 h.p.i.), estos resultados coinciden con los de Boppana y col. (2004) quienes observaron, en ovejas parasitadas por garrapatas del género *Ixodes,* una reducción del número total de linfocitos T al 6º y 9º día post-infestación.

4.3.2.2.- LINFOCITOS T CD4

Dentro de los linfocitos T diferenciamos dos subpoblaciones, los CD4 y los CD 8. La maduración de los linfocitos T no tiene lugar en la médula ósea, sino en el timo. En este órgano todavía son inmaduros y no expresan los receptores para antígenos o marcadores de superficie. Estas células inmaduras migran desde la corteza hacia la médula y luego se ponen en contacto con las células epiteliales, macrófagos y células dendríticas. En su camino hacia la médula de timo, los timocitos empiezan a expresar los receptores para antígenos y marcadores de superficie presentes en los linfocitos T periféricos maduros. Así, la médula contiene principalmente linfocitos T maduros y sólo salen del timo las células T maduras, CD4 ó CD8, comprometidas hacia funciones colaboradoras o citotóxicas, que entran en la sangre y en los ganglios linfáticos periféricos.

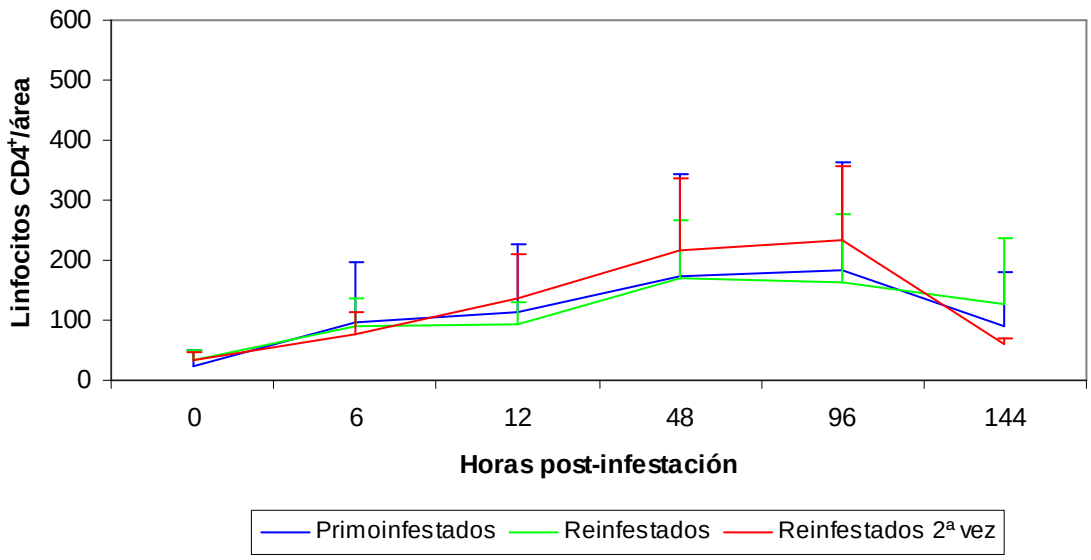


Figura 2.3.- Evolución del número de linfocitos T CD4$^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

Gráficamente, se observa que los animales **primoinfestados** muestran una evolución muy paralela a los animales **reinfestados**, si bien los primeros presentan un nivel máximo a las 96 h.p.i. con un valor de 182,3 ± 90,05 linfocitos CD4/área, mientras que los animales reinfestados muestran el nivel máximo mucho antes (a las 48 h.p.i.), con un número medio de 171,0 ± 96,78 CD4/área. En los animales **reinfestados por 2ª vez** se aprecia un número medio mayor, con un nivel máximo a las 96 h.p.i. de 234,3 ± 121,45 CD4/área (Foto 16). No obstante, de igual forma que

sucedía con los linfocitos CD3, a partir de las 96 h.p.i. comienzan a descender en los tres grupos.

El test ANOVA de muestras repetidas (contraste de Diferencias) reveló un incremento significativo a las 96 h.p.i. en los animales primoinfestados (*F*= 11,689; *P*= 0,042), mientras que, al analizar los animales reinfestados por primera vez se encontró un incremento significativo a las 6 h.p.i. (*F*= 20,023; *P*= 0,021). En los animales reinfestados por segunda vez se observó una elevación significativa a las 96 h.p.i. (*F*= 12,503; *P*= 0,038) coincidiendo con lo que sucedía en los animales primoinfestados.

Mediante contraste Simple no se encontró ninguna diferencia entre los diferentes grupos estudiados (P> 0,05).

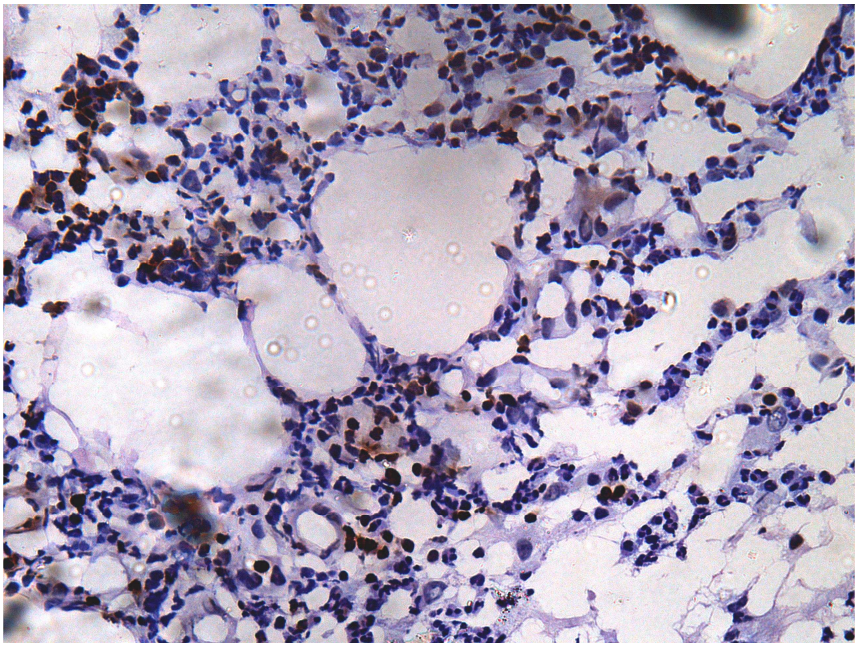


Foto 16.- Población de linfocitos T CD4^{+} en la hipodermis de los animales reinfestados por segunda vez

En cuanto a la distribución de estas células, al igual que sucedía con los linfocitos CD3, el infiltrado se hallaba rodeando principalmente a los pequeños vasos sanguíneos de la dermis superficial y, ocasionalmente, en la dermis profunda.

De acuerdo con McElroy y col. (1998), los parásitos que invaden a su hospedador por vía cutánea provocan un pronto reclutamiento considerable de células CD4 aumentando significativamente a los 4-8 días post-infestación.

Las células T CD4 se encuentran habitualmente en miasis como la provocada por *Lucilia cuprina* (Bowles y col., 1992 y Broadmeadow, 1984). Posteriormente, Colditz y col. (1996) estudiaron la respuesta celular en el punto de entrada de las larvas, observando un aumento significativo de las células CD4 a las 20 y 50 horas post-infestación. Bowles y col. (1996) determinaron los cambios celulares a nivel dérmico tomando biopsias a las 48 horas después de la vacunación con extractos de *Lucilia cuprina*; y de este modo observaron focos celulares inmediatamente por debajo de la epidermis y en la dermis, siendo en su mayoría células T CD4. En cuanto a su distribución, éstas se hallaban fundamentalmente en los focos de inflamación a nivel dérmico.

Nuestros resultados también coinciden con Huntley y col. (2005) quienes observaron que en ovejas con sarna psoróptica, se producía una afluencia inflamatoria de células T CD4, aunque se incrementaban más tarde, en la 5ª semana post-infestación. Otros autores como, van den Broek y col., (2000), señalaron la posibilidad de que la interacción de los antígenos del ácaro con las células CD4 suponga una contribución significativa a la afluencia masiva de eosinófilos observada en las lesiones dérmicas de las ovejas reinfestadas. En el caso de la infestación por L-1 de *H. lineatum* se observa un mayor predominio de los linfocitos T colaboradores y una respuesta eosinofílica intensa con lo cual también cabe la posibilidad de una interacción positiva entre ambos grupos celulares.

4.3.2.3.- LINFOCITOS T CD8

Los linfocitos T CD8 lisan las células que expresan antígenos extraños y de ahí que sean útiles en la eliminación de microorganismos que infectan y viven en el interior de distintos tipos de células. Los receptores para el antígeno en las células T CD4 y CD8 son incapaces de distinguir entre microorganismos extra e intracelulares. Por lo tanto, el reconocimiento específico se hace a través de las vías de presentación del antígeno asociadas a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). De esta forma, los linfocitos T colaboradores reconocen péptidos unidos a moléculas MHC clase II y, por el contrario, las células CD8 reconocen péptidos unidos a moléculas MHC clase I. Por consiguiente, el hecho de que los antígenos se unan a moléculas de clase I o clase II del MHC en la presentación del antígeno asegura que

las células T CD4 y CD8 van a responder frente a aquellos microorganismos a los que van a eliminar más eficazmente.

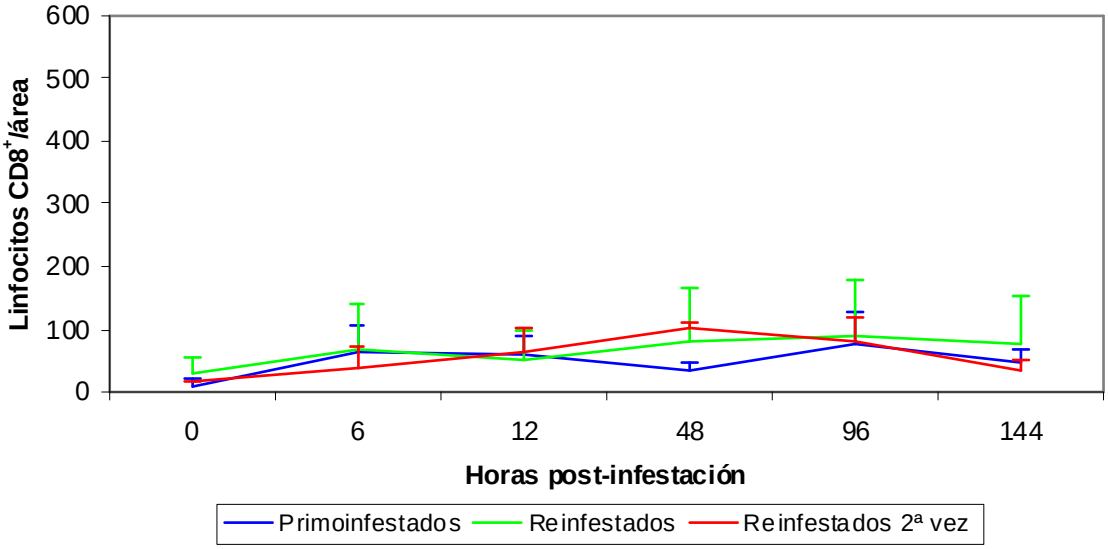


Figura 2.4.- Evolución del número de linfocitos T CD8+ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En la figura 2.4 se observa un comportamiento muy similar en los tres grupos de animales, si bien se puede apreciar en los animales primoinfestados un ligero descenso a las 48 h.p.i. (33,3±14,86 linfocitos CD8/área) para incrementarse de nuevo a las 96 h.p.i. (77,5±51,06 linfocitos CD8/área).

Al analizar el comportamiento de cada uno de los grupos mediante análisis ANOVA de muestras repetidas se observa que en el grupo reinfestado (G-2) hay un incremento significativo a las 6 h.p.i (F= 55,980; P= 0,005) mientras que en el G-3 este incremento significativo se produce de forma más tardía a las 48 h.p.i. (F= 19,472; P= 0,022).

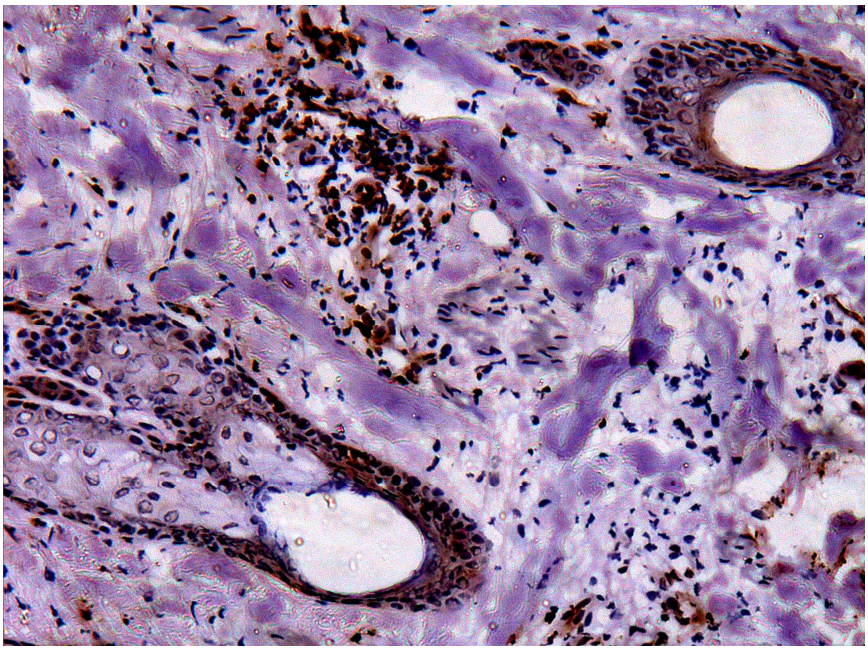


Foto 17.- Población de linfocitos T CD8$^+$marcadas en la dermis superficial de los animales reinfestados

Mediante contraste simple se encontraron diferencias estadísticas entre las poblaciones de CD8 a las 48 h.p.i. (F= 6,827; P= 0,016). Esa diferencia, mediante la prueba Bonferroni por pares se tradujo en en los animales reinfestados por segunda vez, al compararlos con el grupo de los animales primoinfestados (F= 6,827; P= 0,016).

El patrón de distribución de estas células era fundamentalmente perivascular. Si tenemos en cuenta los diferentes estratos de la piel, la mayoría de estas células se distribuían en la dermis superficial y ocasionalmente en la dermis profunda (Foto 17).

Al igual que sucedía con los linfocitos colaboradores CD4, en la piel de vacas y ovejas existe una población de células CD8 normal, si bien su número es menor que el de los CD4.

En la miasis provocada por *Lucilia cuprina*, Bowles y col. (1994) señalaron que en la infección primaria la respuesta se caracterizaba por un número reducido de linfocitos citotóxicos, mostrando el nivel máximo durante las primeras 48 h.p.i. Sorprendentemente, tras 72 horas comprobaron que los CD8 experimentaban un incremento, llegando incluso a superar a los linfocitos colaboradores. Al reinfestar las

ovejas, comprobaron que el incremento de los linfocitos citotóxicos era más pronunciado y se producía de forma más precoz.

En otras parasitosis provocadas por ácaros, van den Broek y col. (2005) comprobaron que los linfocitos CD8 eran muy escasos. Al analizar el comportamiento durante el tiempo del estudio se observó que estas células no mostraban ningún cambio significativo. En cuanto a la localización, se hallaban dispersos aleatoriamente a través de la dermis superficial y profunda, sin mostrar ninguna localización específica.

En la infestación experimental por *Ixodes ricinus* en ratones, Mbow y col. (1994) observaron que en los animales infestados por primera vez, el número de células T CD8 era mayor que en los animales testigo; no obstante, su número era reducido, predominando las células CD4. Estas células T se localizaban fundamentalmente en la dermis y de forma ocasional en la epidermis. En los animales reinfestados por segunda y tercera vez se observaron niveles significativamente más elevados de CD4 y CD8, pero, al igual que en el caso anterior, seguían predominando los linfocitos T colaboradores sobre los citotóxicos.

Por el contrario, Milnes y col. (2007) en un estudio de ganado vacuno infestado con *Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus,* vieron que los linfocitos citotóxicos no mostraban diferencias en los animales infestados al compararlos con el grupo libre del parásito.

4.3.2.4.- RELACIÓN LINFOCITOS T CD4/CD8

Para conocer mejor la respuesta inmune celular en el punto de entrada de las L-1 de *Hypoderma lineatum,* resulta interesante estudiar la proporción de linfocitos citotóxicos y colaboradores. Para ello, calculamos el cociente CD4/CD8, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.3.

Horas post-infestación	0	6	12	48	96	144
Primoinfestados	2,3	1,6	1,8	5,2	2,4	2,0
Reinfestados 1ª vez	1,1	1,3	1,9	2,1	1,8	1,7
Reinfestados 2ª vez	2,1	2,0	2,1	2,1	2,9	1,8

Tabla 2.3.- Coeficiente linfocitos CD4/CD8 en los distintos grupos de animales

Como se puede observar en la Tabla 2.3 el cociente CD4/CD8 en los animales primo y reinfestados por 2ª vez fue bastante similar, excepto a las 48 h.p.i. en que destaca la elevada participación de los linfocitos colaboradores en los primoinfestados.

En todos los grupos se observa un claro predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos, y al estudiar la evolución a lo largo del tiempo, excepto en la medida realizada a las 48 h.p.i., no existen diferencias apreciables entre los distintos grupos de animales, tal como se muestra en la figura 2.5.

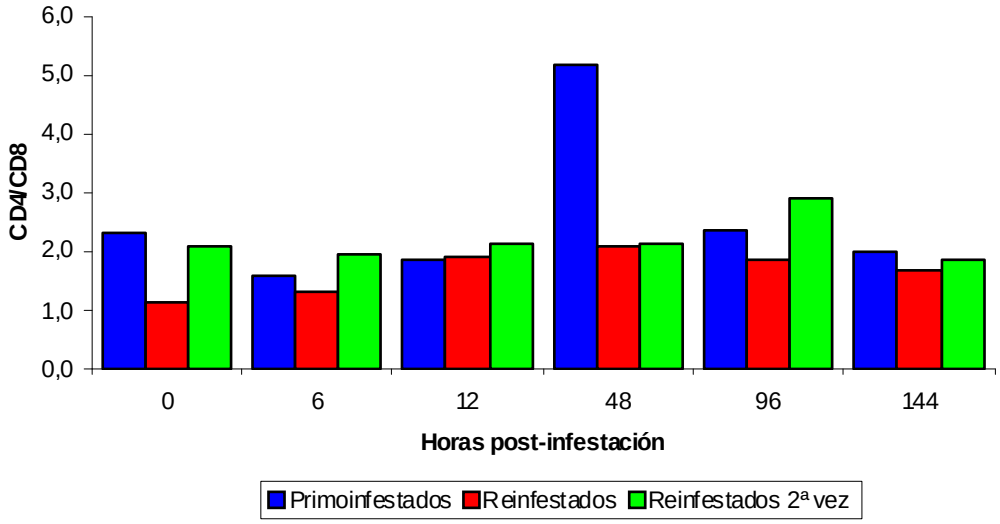


Figura 2.5.- Comparación del cociente de linfocitos T CD4 y CD8+ en los tres grupos de animales

Tenemos que destacar que, en condiciones normales, en la piel normal del ganado vacuno ya existe un cierto predominio de los CD4 frente a los CD8; así, Hein y

Dudler (1997) al analizar los linfocitos T observaron que el 39% eran CD4 y el 35% mostraban el receptor CD8 en su superficie.

En el desarrollo de otras miasis se repite esta tendencia, así Bowles y col. (1994) afirmaron que, en las ovejas primo y reinfestadas por *Lucilia cuprina,* existía un aumento de las células T CD4 sobre las CD8 durante las primeras 48 h.p.i., mientras que tras 72 horas el comportamiento se invertía, es decir, los CD8 excedían a los CD4. Cabe señalar que en las reinfestaciones el aumento de los CD8 era más pronunciado y ocurría de forma más precoz que en las primoinfestaciones (48 h.p.i.). Elhay y col. (1994) en la infestación por esta misma mosca, coincidieron en señalar que los niveles de las células T, CD4 y CD8 aumentaban progresivamente a lo largo del estudio, alcanzando niveles máximos a las 48 h.p.i., correspondiendo el mayor nivel a las primeras.

En este mismo modelo de miasis, Colditz y col. (1996) encontraron un aumento significativo de los linfocitos colaboradores a las 20 y 50 horas post-infestación, mientras que los linfocitos T CD8 mostraron un descenso significativo. De este modo, una vez más, el ratio CD4/CD8 en parasitaciones cutáneas vuelve a superar la unidad. Estos autores sugirieron la posibilidad de que la respuesta celular, y en concreto las poblaciones de linfocitos T, en las que predominan los colaboradores, contribuyen a la menor prevalencia de esta enfermedad en las ovejas resistentes.

En otras parasitaciones como la provocada por *Psoroptes ovis,* van den Broek y col. (2005) comprueban que, en la piel de las ovejas no infestadas, el cociente CD4/CD8 era de 4,3, incrementándose a 19 en 24 horas y a 37 a las 96 horas. Al progresar la infestación los linfocitos CD4 seguían aumentando de tal forma que el cociente CD4/CD8 a los 49 días ya era de 70. Cocientes mayores que la unidad indican mayor predominio de los linfocitos colaboradores, lo cual lleva a pensar en la posibilidad de que la interacción de los antígenos del ácaro con las células CD4 suponga una contribución positiva para la afluencia masiva de los eosinófilos observados en las lesiones cutáneas de las ovejas reinfestadas (van den Broek y col., 2000).

En la infestación experimental por *Ixodes ricinus*, Mbow y col. (1994) trabajando con muestras de piel congeladas, observaron que en los ratones infestados por primera vez, el número de linfocitos colaboradores era superior al de citotóxicos con un ratio de 2,2. En los animales reinfestados por segunda y por tercera vez se

detectaron niveles significativamente más elevados de CD4 y CD8 con un cociente de 3,2 en la infestación secundaria y 4,7 en la terciaria. Boppana y col. (2004) en ovejas parasitadas por garrapatas del género *Ixodes*, observaron una reducción del número de linfocitos citotóxicos al sexto y noveno día post-infestación, mientras que los CD4 aumentaban significativamente. Además, en todas las ovejas reinfestadas hallaron un aumento del cociente CD4/CD8.

Finalmente, Milnes y col. (2007), en un estudio en ganado vacuno parasitado por piojos, comprueban nuevamente que el cociente CD4/CD8 era siempre superior a la unidad, 2,57 en el ganado infestado frente a 1,9 en los animales libres del parásito.

4.3.2.5.- LINFOCITOS B

En la figura 2.6 se observa como, al igual que ocurría en el ensayo 1, en los animales **primoinfestados** la respuesta de los linfocitos B fue poco relevante con un número máximo a las 6 h.p.i. de 41,5±18,91 linfocitos B/área. En los animales **reinfestados por primera vez** se comprueba que comienzan a incrementarse a partir de las 6 h.p.i. hasta un valor máximo de 506,3±452,55 linfocitos B/área a las 48 h.p.i., para a continuación descender hasta llegar a un valor de 245,3±239,12 linfocitos B/área. En el grupo de los **animales reinfestados por segunda vez** se observó un comportamiento similar al del grupo anterior, con un incremento a partir de las 6 h.p.i. hasta un valor máximo de 643,3±525,84 linfocitos B/área a las 48 horas post-infestación e igual que en el caso anterior descienden a las 144 h.p.i. (368±438,19 linfocitos B/área).

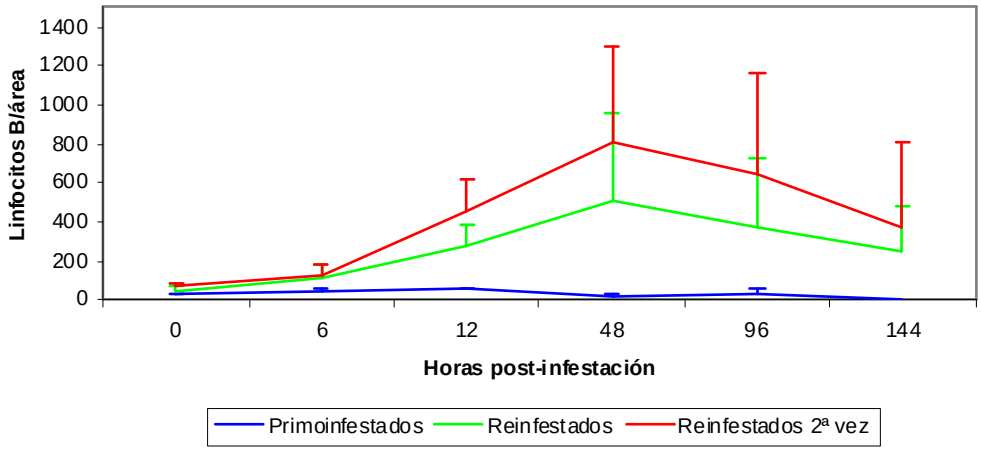


Figura 2.6.- Evolución del número de linfocitos B a nivel dérmico en los tres grupos de animales

Al analizar el comportamiento de cada uno de los grupos se observó que el grupo primoinfestado presenta una disminución significativa en el muestreo a las 48 horas (F= 50,453; *P*= 0,006) y a 144 h.p.i. (F= 34,953 *P*= 0,010) frente a las tomas anteriores, mientras que en los animales reinfestados por primera vez se constató un incremento significativo a las 12 h.p.i (F= 18,165; *P*= 0,024). Finalmente, en los animales reinfestados por segunda vez se halló también un incremento significativo a las 12 h.p.i (F= 18,375; *P*= 0,023).

El contraste Simple en el análisis de varianza de muestras repetidas encontró diferencias entre grupos en las muestras de piel tomadas a las 12 h.p.i. (F= 9,474; *P*= 0,006). La prueba de contraste por pares Bonferroni mostró que los animales reinfectados por segunda vez (G-3) presentaban un aumento significativamente mayor en los linfocitos B que los animales primoinfestados (*P*= 0,006).

Una vez más, al analizar el patrón de distribución de estas células se comprobó que era fundamentalmente perivascular. Si tenemos en cuenta los diferentes estratos de la piel, la mayoría de estas células se distribuyen en la dermis superficial y solo ocasionalmente en la dermis profunda (Foto 18).

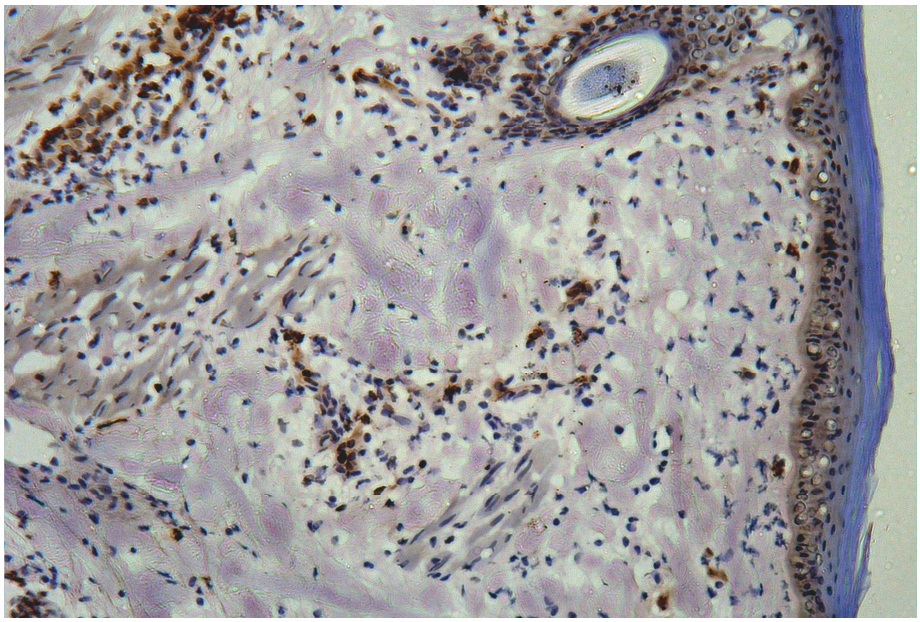


Foto 18.- Población de linfocitos B marcadas en la dermis superficial y profunda de los animales reinfestados

Estos resultados corroboran los obtenidos en el ensayo 1, confirmando que la respuesta inmune celular en animales primoinfestados, caracterizada por una infiltración perivascular de células BAQ44A$^+$, es muy reducida. Estos resultados coinciden, en general, con los de Baron y Colwell (1991); Gingrich (1982) y Robertson (1980) quienes señalaron que en estas condiciones la respuesta anticuerpo es más lenta. De este modo, Pruett y Barrett (1984) y Pruett y col. (1987) comenzaron a detectar IgG específicas frente a antígenos de las larvas de *H. lineatum* a partir de las 4-6 semanas p.i. en animales primoinfestados, comprobando que las respuestas se intensificaban progresivamente durante 3-4 semanas.

Por el contrario, en ganado reinfestado el número de linfocitos B a nivel local aumentó considerablemente con el número de infestaciones previas, alcanzando valores máximos a las 48 h.p.i. Sin embargo, a pesar de esta elevación, los niveles de anticuerpos durante estas fases tan tempranas de la infestación permanecieron negativos durante todo el estudio. Estos resultados coinciden con los de Pruett y Barrett (1985), Colwell y Baron (1990) y Panadero (1996) quienes afirmaron que en la infestación por *Hypoderma* sp. los anticuerpos no se detectan en suero hasta

aproximadamente 3-4 sem.p.i., si bien esta respuesta es más rápida en las reinfestaciones.

En estos animales la respuesta inmunitaria celular es mucho más intensa debido a que se genera una respuesta de memoria específica frente a nuevas infestaciones posteriores. Sin embargo, una vez que las larvas de *H. lineatum* ya han atravesado la piel y han comenzado a migrar hacia el esófago, el número de células B a nivel cutáneo desciende considerablemente.

Curiosamente, Mbow y col. (1994) sobre muestras de piel congeladas de ratones parasitados no detectaron linfocitos B ni en los ratones primoinfestados ni en los reinfestados por segunda o tercera vez. No obstante otros autores como Boppana y col. (2004), en ovejas parasitadas por garrapatas del género *Hyalomma anatolicum,* apreciaron un aumento significativo de los linfocitos B tanto en la infestación primaria como en la secundaria.

4.3.2.6.- MACRÓFAGOS

Todas las células del sistema fagocítico mononuclear se originan en la médula ósea y, tras su maduración y posterior activación, pueden adquirir diferentes tipos morfológicos. Los monocitos son células que no están completamente diferenciadas y que entran en la sangre periférica después de dejar la médula ósea. Una vez que colonizan los tejidos, maduran y se convierten en macrófagos, también llamados histiocitos. Los macrófagos son células presentadoras de antígeno por lo que participan en la inmunidad adaptativa.

Tenemos que destacar que en ningún de los tres grupos de animales de este ensayo se detectaron macrófagos durante la infestación experimental.

En otras parasitosis cutáneas se ha hallado esta población celular, como por ejemplo, en la infestación por *Ixodes ricinus*, Mbow y col. (1994), en muestras de piel congeladas, de los ratones testigo observaron una pequeña población de células dendríticas y macrófagos localizados fundamentalmente en la epidermis. En ratones infestados por primera vez, encontraron alguna célula dendrítica y un número considerable de células mononucleares, como por ejemplo macrófagos. En los animales reinfestados por segunda y tercera vez, detectaron un mayor número de

células dendríticas cutáneas, células mononucleares como macrófagos, y monocitos y alguna célula de Langerhans en la epidermis.

Broadmeadow y col. (1984) analizaron la respuesta celular cutánea en el punto de penetración de las L-1 de *Lucilia cuprina*, y encontraron en el lugar lesionado un número elevado de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Posteriormente, Elhay y col. (1994), percibieron un incremento en las células marcadas con el MHC tipo I y II a las 24-48 h.p.i. Éstas células eran fundamentalmente células de Langerhans y macrófagos. Así mismo, Nash y col. (1996), en esta misma parasitosis hallaron una respuesta inflamatoria aguda precoz, caracterizada por una infiltración de polimorfonucleares, acompañada por un número reducido de linfocitos en las áreas adyacentes a la lesión larvaria. En las 6 primeras horas tras la infestación advirtieron gran cantidad de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células de Langerhans. Al progresar la infección (24-48 h.p.i.), los macrófagos y eosinófilos seguían presentes aunque tendieron a localizarse en la dermis en lugar de en la zona adyacente de la epidermis lesionada.

4.3.2.7.- CÉLULAS MHC TIPO II

Los leucocitos contienen una serie de glicoproteínas antigénicas denominadas complejos antigénicos principales de histocompatibilidad (MHC) que actúan como marcadores. Su función es permitir que los linfocitos T puedan reconocer las células propias de las invasoras. Las MHC de tipo I son proteínas de membrana existentes en todas las células del organismo excepto los glóbulos rojos, mientras que las MHC de tipo II sólo están presentes en las células del timo o en las células T que han sido activadas por exposición a un antígeno.

Los antígenos parasitarios procedentes de las L-1 de *Hypoderma lineatum* son capturados por las células presentadoras de antígenos, las cuales están representadas en la piel fundamentalmente por las células de Langerhans; allí serían procesados y los epítopos conjugados con proteínas de la clase II del complejo principal de histocompatibilidad para ser presentados posteriormente a las células T.

En la piel de los tres grupos de animales infestados por larvas 1 de *Hypoderma lineatum* hallamos un pequeño número de estas células que aparecen representadas en la figura 2.7.

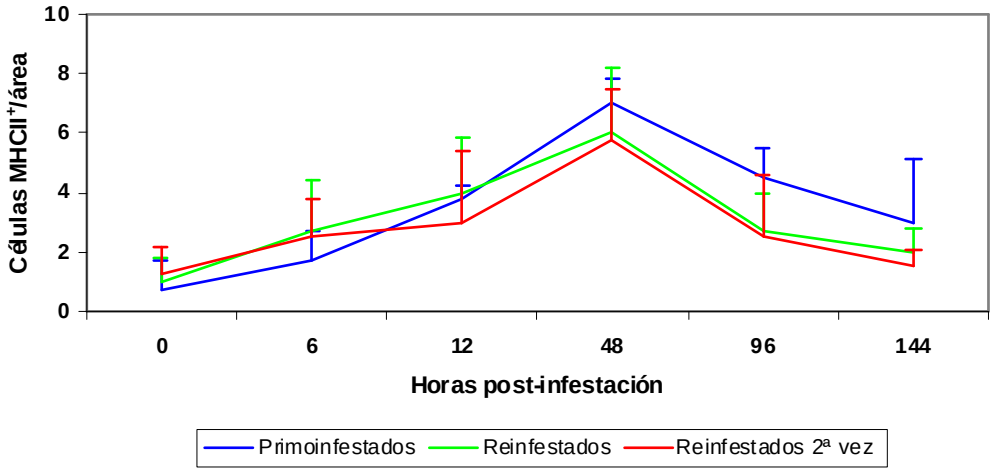


Figura 2.7.- Evolución del número de células MHC Tipo II$^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

Los **animales primoinfestados** mostraron un aumento desde el principio de la infestación hasta llegar a un máximo a las 48 h.p.i. con 7±0,82 células/área, para a continuación disminuir progresivamente hasta las 144 h.p.i.

En los **animales reinfestados por primera vez** se observó un comportamiento similar al grupo anterior, con un incremento progresivo hasta las 48 h.p.i. para posteriormente comenzar a bajar. Finalmente, en el **grupo reinfestado por segunda vez** la evolución fue paralela a la de los otros grupos.

Los animales primoinfestados mostraron el mayor número de células presentadoras de antígeno, lo cual podría indicar una mayor exposición del antígeno al sistema inmunitario del animal con el fin de desarrollar una respuesta más intensa.

Al realizar el test ANOVA de muestras repetidas no se detectó ninguna diferencia entre los diferentes grupos. Al analizar la evolución de cada grupo, se observó en los animales primoinfestados un aumento significativo a las 12 h.p.i (F= 24,000; *P*= 0,016) y a las 48 h.p.i. (F= 26,684; *P*= 0,014) frente al conjunto de las

tomas previas. En los animales del grupo reinfestado por 1ª se detectó una elevación a las 48 h.p.i. (F= 24,000; *P*= 0,016) y, a diferencia del grupo anterior, se produjo un descenso significativo a las 96 h.p.i. Finalmente, en el grupo reinfestado por segunda vez, las cifras de células marcadas aumentaron de forma significativa a las 6 h.p.i., en comparación con el valor inicial (F= 25,000; *P*= 0,015) y lo mismo sucedió a las 48 h.p.i. (F= 33,000; *P*= 0,010). Al igual que sucedía con G-2, en este grupo también se constató un descenso significativo a las 96 h.p.i. (F= 46,091; *P*= 0,007).

En la infestación por *Lucilia cuprina,* Bowles y col. (1994) no hallaron diferencias significativas en el número de células MHC tipo II entre los animales testigo e infestados; sin embargo, en un ensayo vacunal realizado con posterioridad (Bowles y col., 1996) hallaron un gran número de células que expresaban el MHC tipo II y que se distribuían fundamentalmente en los focos de inflamación. Del mismo modo, Elhay y col. (1994) comprobaron que a las 24-48 h.p.i. se producía un incremento en las células marcadas con el MHC tipo I y II, tratándose fundamentalmente de células de Langerhans y macrófagos. Nash y col. (1996), en ovejas infestadas por esta misma larva parásita hallaron una infiltración caracterizada por una gran cantidad de neutrófilos, eosinófilos y células MHC II.

Milnes y col. (2007), en vacas infestadas por piojos, apreciaron que las células MHC de tipo II eran significativamente superiores a las de las sanas. No obstante, estas diferencias sólo fueron significativas en la dermis superficial. La mayor parte de estas células tenían un aspecto dendrítico, por lo que se trataría de células presentadoras de antígeno muy importantes en la reacción inflamatoria. En la infestación por *Bovicola ovis,* Shu y col. (2009) comprobaron que tras la inyección intradérmica del antígeno los niveles de células marcadas con MHC tipo II+ y las células CD1b+ aumentaban significativamente a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección del antígeno.

4.3.3.- PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS A NIVEL CUTÁNEO EN ANIMALES INFESTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *H. lineatum*

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas en respuesta a un estímulo inmunitario, que influyen sobre las funciones de otras células como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, monocitos, fibroblastos, etc.

En este estudio hemos incluido el análisis del factor de necrosis tumoral, interferon-gamma, interleuquina 12, interleuquina 10 e interleuquina 4.

4.3.3.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α (TNF-α)

El TNF-α es una citoquina proinflamatoria producida por numerosas células del sistema inmune, cuyos efectos son importantes en las respuestas inflamatorias locales frente a los agentes extraños.

En la figura 2.8 se observa que el número de células TNF-α^+ en la piel de los tres grupos de animales infestados por L-1 de *H. lineatum* fue, en general, bastante reducido.

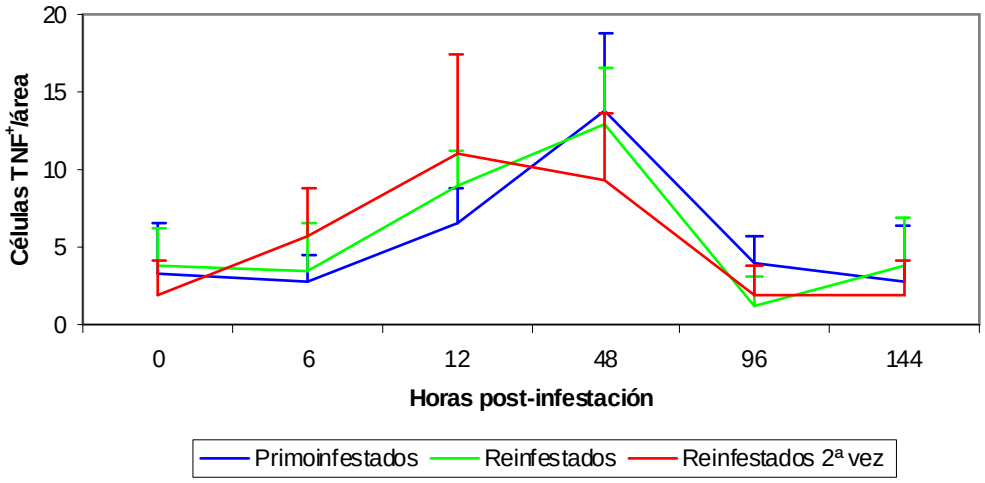


Figura 2.8.- Evolución del número de células TNF-α^+ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados** el número de células marcadas se incrementó desde el comienzo de la infestación hasta llegar a un máximo a las 48 h.p.i (13,75±4,99 células TNF-α^+/área), para posteriormente descender bruscamente hasta el final del estudio (2,75±3,59 células TNF-α^+/área).

En el grupo de los **animales reinfestados por 1ª vez** se observó un comportamiento similar al grupo anterior con un incremento hasta las 48 h.p.i (13±3,56 células TNF-α^+/área), y posteriormente descendieron hasta llegar al mínimo a las 96 h.p.i (1,25±1,89 células TNF-α^+/área).

Finalmente, en los animales que habían tenido más contactos previos con el parásito, **reinfestados por 2ª vez**, se observó de nuevo un incremento con un nivel máximo a las 12 h.p.i. (11±6,38 células TNF-α^+/área), para descender posteriormente hasta las 96 horas post-infestación con cifras medias de 2±1,83 células TNF-α^+/área.

El análisis de varianza de muestras repetidas (contraste de diferencia) mostró variaciones significativas en el número de células TNF-α^+ de los 3 grupos de animales a las 12 h.p.i. (F= 10,075; *P*= 0,050 para G-1; F= 17,286; *P*= 0,025 para G-2 y F= 10,099; *P*= 0,050 para G-3), mientras que a las 48 h.p.i. estas variaciones sólo fueron significativas para G-1 (F= 12,429; *P*= 0,039) y G-2 (F= 32,000; *P*= 0,011). Finalmente, a las 96 h.p.i. se detectó un descenso significativo en el número de células marcadas en todos los grupos de animales (F= 14,486; *P*= 0,032 para G-1; F= 47,670; *P*= 0,006 para G-2 y F= 14,095; *P*= 0,033 para G-3).

Mediante contraste Simple se detectaron diferencias entre el número de células marcadas de los grupos de animales a las 48 h.p.i. (F= 4,630; *P*= 0,041), localizándose estas diferencias mediante la técnica de comparación de pares Bonferroni, entre los animales del G-1 y G-3 (*P*= 0,045).

En cuanto a la distribución de las células marcadas, se vió que se localizaban de forma aislada en toda la dermis superficial, mientras que en la dermis profunda apenas se hallaron y en los demás estratos cutáneos no se observó ninguna célula marcada. Al contrario de lo que sucedía con las demás células, estas no seguían un patrón perivascular, localizándose de forma aleatoria.

Al comparar con otras ectoparasitosis, se observó que en ratones infestados experimentalmente por *Ixodes ricinus*, Mbow y col. (1994) los valores máximos de

TNF-α se detectaron a las 72 h.p.i. De forma similar a lo que sucedió en nuestro estudio en los animales infestados por segunda y tercera vez, los niveles de esta citoquina en las células que infiltraban la dermis fueron más elevados que en los primoinfestados y el patrón de secreción era similar al caso anterior. De esta forma, los autores llegaron a la conclusión de que, a diferencia de lo que sucede durante la penetración de las L-1 de *H. lineatum*, la secreción local de TNF-α a partir de los linfocitos T y queratinocitos es muy importante en las infestaciones por garrapatas. Por el contrario, en la infestación por el piojo *Bovicola ovis* la expresión de TNF-α no era significativamente diferente en los animales infestados y libres del parásito. Kurimoto y Streilen (1992) afirman que, un aumento de la secreción de esta citoquina por los queratinocitos, tras una primera estimulación, conduce a la inmovilización de las células de Langerhans de modo que, un importante número de células presentadoras de antígeno permanecen en la piel donde pueden interactuar con el infiltrado de linfocitos T.

En la miasis traumática provocada por *Lucilia cuprina*, Elhay y col. (1994) comprobaron que esta parasitosis modificaba perceptiblemente la expresión del mRNA que codifica para el TNF-α en la piel. La liberación local de TNF-α puede ser de gran importancia en la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la piel, no obstante, la escasa participación de esta citoquina en nuestro estudio en la piel de los animales infestados pueden deberse a una serie de factores como la naturaleza del desafío antigénico, por ejemplo, las características de los alérgenos, la ausencia de traumatismos en las lesiones, así como la ausencia de infección microbiana ya que la producción del TNF-α representa un mecanismo de defensa frente a la infección bacteriana en las superficies epiteliales.

4.3.3.2.- INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ)

Esta citoquina forma parte del grupo de las respuestas Th1 y sus principales funciones son la activación de los fagocitos mononucleares, favorecer la activación de las células T CD4 y, también es necesaria para la maduración de los CD8, entre otras muchas funciones. De esta forma, su efecto más directo consiste en favorecer las reacciones inflamatorias ricas en macrófagos, y al tiempo inhibir reacciones ricas en eosinófilos dependientes de IgE.

En la gráfica 2.9 se muestra la evolución del número de células marcadas con esta citoquina en la dermis de los tres grupos de animales:

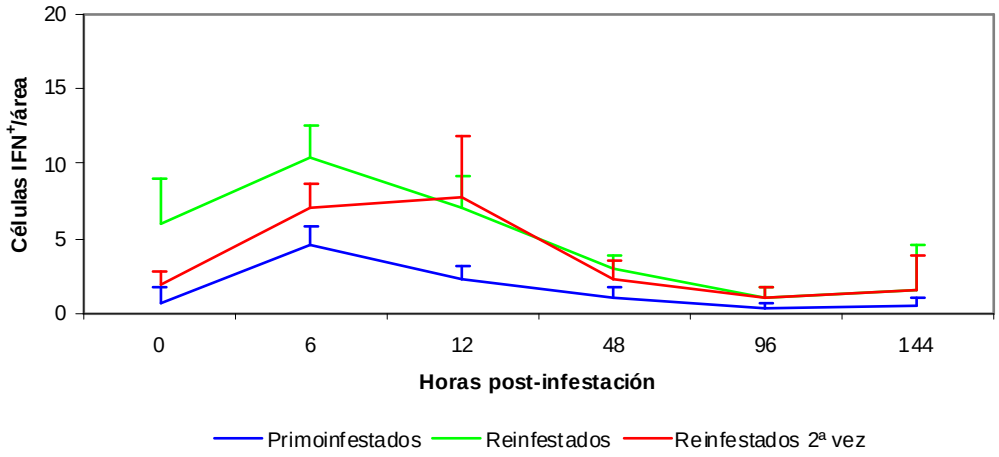


Figura 2.9.- Evolución del número de células IFN-γ$^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados** se observa un incremento inicial con un nivel máximo a las 6 h.p.i (4,50±1,29 células IFN-γ$^+$/área), para a continuación descender hasta el final del estudio, con un valor mínimo a las 96 h.p.i. (0,25±0,50 células IFN-γ$^+$/área).

En los **animales reinfestados por 1ª vez** se observa un comportamiento similar es decir, se produce un incremento inicial con una elevación a las 6 h.p.i. (10,50±2,08 células IFN-γ$^+$/área) para posteriormente caer bruscamente hacia las 144 h.p.i. (1,50±3 células IFN-γ$^+$/área).

Finalmente, en los **animales reinfestados por 2ª vez** se constata de nuevo un incremento a las 6 h.p.i., pero en estos animales el IFN-γ se mantiene elevado hasta las 12 h.p.i. (7,75±4,11 células IFN-γ$^+$/área), momento a partir del cual comienza a reducirse.

El análisis de varianza de muestras repetidas (contraste de diferencia) indicó que el número de células que expresaban esta citoquina se incrementaba de forma significativa a las 6 h.p.i. en los tres grupos de animales con respecto a los niveles existentes antes de la infestación (F= 19,286; *P*= 0,022 para G-1, F= 27,000; *P*= 0,044 para G-2 y F= 30,000; *P*= 0,012 para G-3). Este aumento fue seguido de un descenso

significativo a las 12 h.p.i. en los animales primoinfestados (F= 22,091; *P*= 0,018) y en los reinfestados por 1ª vez (F= 29,400; *P*= 0,012), mientras que, en los reinfestados por 2ª vez, este descenso se produjo más tarde a las 48 h.p.i. (F= 14,520; *P*= 0,032).

El contraste Simple no mostró diferencias significativas entre el número de células marcadas en los diferentes grupos de animales.

Las células marcadas se localizaban de forma aislada en toda la dermis superficial, mientras que en la dermis profunda apenas se hallaban. Al contrario de lo que sucedía con la distribución de las células linfocitarias, estas no seguían un patrón perivascular, localizándose de forma aleatoria.

A pesar de que, en general, en las infecciones por parásitos extracelulares como helmintos y artrópodos, la activación de las células T induce la expresión de un perfil de citoquinas Th2, siendo el Th1 (IFN-γ) típico de las infecciones intracelulares y bacterianas, son numerosos los estudios de artropodosis en los que se produce un aumento en la producción de IFN-γ:

En la miasis provocada por *Lucilia cuprina,* Bowles y col. (1994) encontraron un aumento del nivel de IFN-γ tras la infección, siendo más elevado en la infestación secundaria.

Tanto el TNF-α como el IFN-γ pueden ser potentes inductores de la migración linfocitaria en la piel (Colditz y col., 1996), si bien no hallaron ninguna evidencia de un posible efecto de los linfocitos T ni del IFN-γ en la modificación del crecimiento larvario durante las primeras 50 horas de infestación.

Este efecto inductor de la migración linfocitaria se constata en nuestros resultados, así, el incremento precoz de las células IFN-γ^+ coincide con el infiltrado inflamatorio en los animales reinfestados por segunda vez en los que, a las 6 h.p.i. ya pudo observarse a nivel de la dermis superficial un infiltrado perivascular moderado, compuesto principalmente por células mononucleares, eosinófilos y neutrófilos. A partir de las 12 h.p.i la reacción cutánea se incrementó considerablemente con infiltrados inflamatorios perivasculares en los que podía observarse numerosas células mononucleares y eosinófilos. Esta relación también se comprobó en los animales reinfestados, de tal forma que el mayor acumulo de estas células inflamatorias se producía a partir de las 12 h.p.i. alcanzándose el nivel máximo entre las 48-96 h.p.i.

En nuestro estudio, el número de células positivas al IFN-γ comenzó a aumentar de forma significativa en los tres grupos de animales a las 6 h.p.i. Estos resultados fueron similares a los de Elhay y col. (1994), quienes detectaron en la piel de ovejas infestadas con *Lucilia* un aumento muy temprano de la expresión de esta citoquina que alcanzaba el nivel máximo a las 6 h.p.i. No obstante, al progresar la infestación (24-48 h.p.i.) el IFN-γ seguía detectándose en niveles apreciables. Por el contrario, en un estudio similar, Nash y col. (1996) no hallaron un incremento del IFN-γ, al contrario encontraron niveles reducidos en la piel de las ovejas infestadas, a las 24-48 h.p.i.

Mbow y col. (1994) en ratones infestados por *Ixodes ricinus* no detectaron aumentos significativos hasta las 72 h.p.i., incrementándose con el número de contactos previos. Hay que destacar que mientras que, tras sucesivas reinfestaciones el número de células positivas al IFN-γ aumentaba el de IL-4 disminuía, concluyendo que los antígenos de la garrapata potencian la expresión del IFN-γ reduciendo la de la IL-4. No obstante, en un estudio *in vitro*, Kopecky y col. (1999) comprobaron que la saliva de *Ixodes ricinus* disminuía notablemente la secreción de IFN-γ en cultivos de células de bazo.

Ramachandra y Wikel (1995) demostraron que la saliva de las formas adultas de *Dermacentor andersoni* inhiben parcialmente la secreción de citoquinas como el IFN-γ, IL-1 y TNF-α, así como la diferenciación de las células linfocitarias.

En corderos infestados por piojos, Pfeffer y col. (2007) no encontraron esta interleuquina en la piel de los animales parasitados, hallando sin embargo, un incremento significativo de la IL-4. Shu y col. (2009) tampoco encontraron diferencias significativas en la expresión de esta citoquina en los corderos sanos e infestados, mientras que sí hallaban diferencias en el patrón de secreción de otras citoquinas de perfil Th2.

En otras parasitosis cutáneas como en el caso de *Leishmania major* el IFN-γ constituye una citoquina importante a nivel dérmico sobre todo en los animales primoinfectados (Fong y Mosmann, 1990; Belkaid y col., 2000). Por otra parte, Swihart y col. (1995) comprobaron que en ratones genéticamente resistentes, la ausencia de la expresión de los genes para IFN-γ o su receptor aumenta la susceptibilidad a la infección. Más tarde, Alves y col. (2008) constataron que los animales asintomáticos

presentan el mayor nivel de IFN-γ lo cual indicaba que esta citoquina desempeña un papel importante en la protección contra la infección.

4.3.3.3.- INTERLEUQUINA 10 (IL-10)

Esta interleuquina actúa como un inhibidor de las respuestas del hospedador, sobre todo de aquellas en las que están implicados macrófagos, contribuyendo a la finalización de la respuesta inmune y a la consecución del estado de reposo del sistema inmune (Mosmann, 1994).

En la figura 2.10 se puede apreciar la evolución del número de células positivas a esta interleuquina en la piel de los animales infestados.

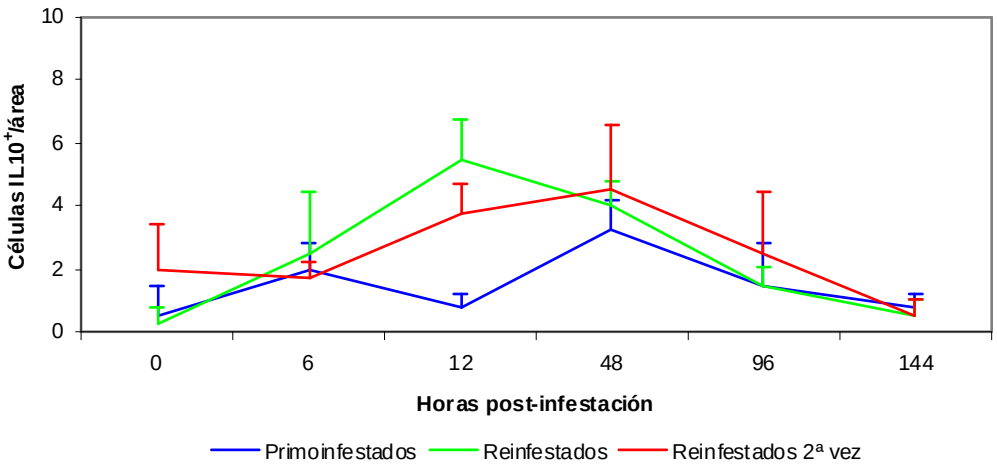


Figura 2.10.- Evolución del número de células IL-10$^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados**, se produjo una elevación inicial a las 6 h.p.i. para descender a las 12 h.pi., y posteriormente alcanzar un nivel máximo a las 48 h.p.i. (3,25±0,96 células IL-10$^+$/área). A partir de este punto comenzaron a descender hasta el final del estudio a las 144 h.p.i. En los **animales reinfestados por 1ª vez** se alcanzaron valores máximos a las 12 h.p.i. (5,5±1,29 células IL-10$^+$/área) para a partir de ahí disminuir hasta el final de la toma de muestras con un valor de

0,5±0,58 células IL-10$^+$/área. Finalmente, los **animales reinfestados por 2ª vez** mostraron un aumento progresivo hasta las 48 h.p.i. (4,50±2,08 células IL-10$^+$/área).

El análisis de varianza de muestras repetidas indicó que el número de células IL-10$^+$ en los animales primoinfestados se incrementaba de forma significativa a las 6 h.p.i (F= 27,000; *P*= 0,014) al compararlos con los niveles previos a la infestación. Posteriormente, se produjo un descenso significativo a las 12 h.p.i. (F= 25,000; *P*=0,015), para incrementarse nuevamente de forma significativa a las 48 h.p.i (F= 25,000; *P*= 0,015). En ambos grupos reinfestados (G-2 y G-3), el número de células marcadas se incremento significativamente a las 12 h.p.i con respecto a los muestreos previos (F= 18,000; *P*= 0,024; F= 24,000; *P*= 0,006 para G-2 y G-3, respectivamente).

La prueba de contraste simple mostró diferencias significativas en el número de células de los distintos grupos (F= 20,314; *p*< 0,001) las 12 h.p.i., siendo el número de células marcadas significativamente menor en los animales primoinfestados que en los reinfestados (*P*= 0,001 frente a G-2 y *P*= 0,004 frente a G-3). A las 48 h.p.i. también se encontraron diferencias entre grupos con el contraste Simple (F= 5,848; *P*= 0,024); al utilizar la técnica de diferenciación por pares pudo observarse que el número de células positivas fue mayor en G-2 que en G-1

En cuanto a la distribución de las células marcadas, al igual que sucedió con el resto de las citoquinas estudiadas, éstas se localizaban de forma aislada por toda la dermis superficial, mientras que apenas encontraron en la dermis profunda.

La IL-10 juega un importante papel en el control de ciertas enfermedades parasitarias como la esquistosomosis, toxocariosis, etc, disminuyendo las respuestas linfoproliferativas, modulando las respuestas granulomatosas e incluso induciendo la apoptosis de células T (Boros y Whitfield, 1998).

En nuestro estudio el número de células positivas en los animales primoinfestados aumentó de manera significativa en las primeras 6 h.p.i., mientras que en los grupos reinfestados lo hizo más tarde; estos resultados sugieren que en estos animales la respuesta inflamatoria como resultado de la penetración larvaria es menor, favoreciendo la supervivencia y migración de las L-1. Por el contrario, el retraso en la elevación de esta citoquina en los animales reinfestados produciría una mayor respuesta inflamatoria alrededor de las larvas, lo que contribuiría a aumentar la acción patógena del parásito y podría explicar el aumento de la mortalidad larvaria en los

animales reinfestados que se traduce en una reducción significativa del número de barros en el dorso de los animales que observaron otros autores (Baron y Weintraub, 1986; Panadero, 1996; Pruett y Kunz 1996).

De forma similar, en perros infectados por *Leishmania*, la expresión de la IL-10 era superior en los animales que manifestaban síntomas clínicos (Alves y col. 2008).

Otra función de la IL-10 durante la hipodermosis es la inhibición de las reacciones granulomatosas, favoreciendo la migración y supervivencia de las larvas 1 durante su migración intraorgánica.

En la parasitación por garrapatas, Kopecky y col. (1999) observaron un aumento en la secreción de IL-10, sugiriendo que esta citoquina podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de la saliva de las garrapatas.

La importancia de la IL-10 vuelve a ponerse de manifiesto en ratones infectados por *Triquinella spiralis,* en los que la expulsión de adultos del intestino se asoció con una mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th-2 que se tradujo en una secreción importante de las citoquinas como la IL-10 (Helmby y Grencis, 2003).

Por otra parte, la producción de IL-10 y otras citoquinas de tipo Th-2 contrarresta la acción de otras citoquinas de tipo Th-1. Así, en las toxoplasmosis, Miller y col. (2006) comprobaron que los linfocitos CD4 producían cantidades significativas de IL-4 e IL-10 que anulaban la respuesta inmunitaria del IFN-γ con el fin de conseguir una respuesta adecuada. En el caso de las trematodosis, Flynn y Mulcahy, (2008) comprobaron que la IL-10 regulaba la producción del IFN-γ a lo largo de la infección, constatando que esta regulación conllevaba la supresión y facilitaba la supervivencia del parásito. Esta interleuquina desempeña un papel muy importante en el control del IFN-γ; de esta, forma Zhang y col. (2005), en ovejas parasitadas por *Fasciola,* sugirieron que el IFN-γ y la IL-10 estaban implicadas en la respuesta protectora, ya que el primero activa la producción de óxido nítrico por los macrófagos y la segunda disminuye la producción de IFN-γ, con lo que también se reduce la cantidad de óxido nítrico. Esta regulación es muy interesante ya que impide los daños que causaría una concentración excesiva de óxido nítrico.

4.3.3.4.- INTERLEUQUINA 4 (IL-4)

El papel principal de esta citoquina es promover la proliferación de los linfocitos B que han sido activados por un antígeno u otras moléculas de la superficie de las células. La respuesta de los linfocitos B a la IL-4 puede ser inhibida por el IFN-γ. Por tanto, la IL-4 desempeña un papel importante en las reacciones inflamatorias mediadas por IgE y eosinófilos/mastocitos. Asimismo produce un aumento de la expresión de MHC de clase II y de presentación de antígeno.

La evolución en la producción de esta citoquina durante la penetración de las L-1 de *H. lineatum* en la dermis del ganado vacuno aparece representada en la figura 2.11.

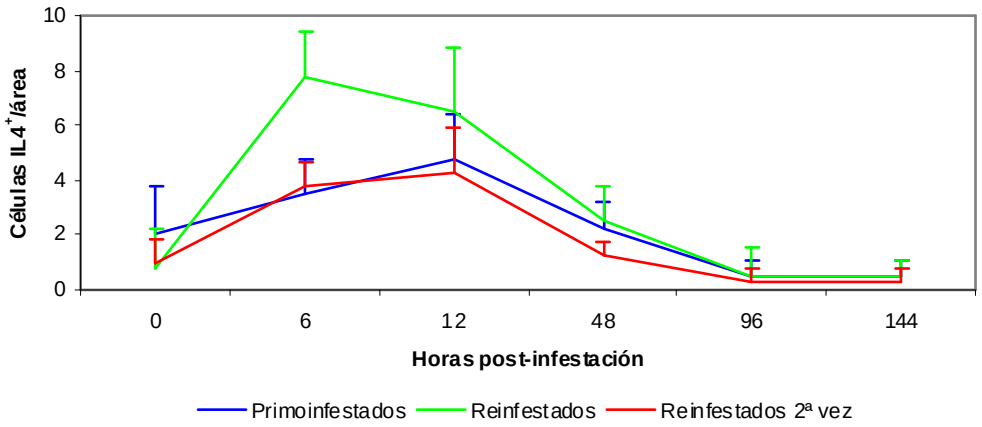


Figura 2.11.- Evolución del número de células IL-4$^+$ a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados** se observó un incremento desde el inicio de la infestación hasta las 12 h.p.i en donde se halló el valor máximo (4,75±1,71 células IL-4$^+$/área) para a continuación reducirse hasta el final de la infestación con un valor mínimo a las 114 h.p.i. (0,5±0,58 células IL-4$^+$/área).

Por el contrario, en los **animales reinfestados por 1ª vez** constatamos un aumento muy acusado con un valor máximo a las 6 h.p.i (6,50±2,38 células IL-4$^+$/área) y a continuación comienzan a descender conforme avanza el tiempo de infestación, llegando a un mínimo de 0,5±0,58 células IL-4$^+$/área a las 144 h.p.i.

Por último, el grupo de los **animales reinfestados por 2ª vez**, mostraron un comportamiento muy similar a los animales primoinfestados con un nivel máximo a las 12 h.p.i (4,25±1,71 células IL-4^+/área) y nuevamente el número de células marcadas desciende hasta alcanzar un valor casi inapreciable de 0,25±0,5 células IL-4^+/área.

El análisis de varianza de muestras repetidas indicó que el número de células IL-4^+ en los animales primoinfestados no presentaba diferencias significativas hasta las 48 (F= 25,000; *P*= 0,015) y 96 h.p.i. (F= 49,000; *P*= 0,006) horas en donde se produce un descenso significativo con respecto al valor anterior. En ambos grupos reinfestados, el número de células marcadas se incremento significativamente a las 6 h.p.i (F= 294,000; *P*< 0,001 para G-2 y F= 33,000; *P*= 0,010 para G-3), manteniendo niveles elevados durante 6 horas para posteriormente experimentar un descenso significativo a las 48 h.p.i. (F= 10,667; *P*= 0,047 para G-2 y F= 10,800; *P*= 0,046 para G-3).

El contraste simple mostró diferencias significativas entre el número de células marcadas entre los distintos grupos de animales a las 6 h.p.i. (F= 16,859; *P*= 0,001), localizándose estas diferencias entre G-1 y G-2 (*P*= 0,001) y entre G-1 y G-3 (*P*= 0,006).

En cuanto a la distribución, como es habitual en las citoquinas detectadas en estos animales, las células marcadas se localizaban de forma aislada por toda la dermis superficial, mientras que en la dermis profunda apenas se observaban.

La IL-4 es un potente regulador de la respuesta inmunitaria, este hecho se observa claramente por el incremento significativo de los animales reinfestados por primera vez a las 6 horas postinfestación frente a los animales primoinfestados. Además, esta citoquina desempeña un importante papel en la producción de IgE, la cual está muy implicada en la patogénesis y en la acumulación de eosinófilos en las respuestas inflamatorias en la hipodermosis. Esta relación con la respuesta eosinofílica se constata claramente en el estudio histopatológico de la dermis, de tal forma que en los animales primoinfestados el número de eosinófilos es reducido. Por el contrario, los animales reinfestados mostraban incrementos continuos entre las 6 y 48 h.p.i., con un descenso final a las 96 h.p.i. De esta forma en los animales reinfestados durante la penetración larvaria se produce un incremento de las células que expresan la IL-4, de las células plasmáticas y de los eosinófilos. Estos

incrementos sucesivos cesan una vez que las L-1 de *H. lineatum* completan la penetración.

La producción de IL-4 a nivel cutáneo ha sido, en general, poco estudiada. En la miasis por *Lucilia cuprina,* Nash y col. (1996) no encontraron esta interleuquina el la dermis de ningún animal parasitado. Sin embargo, en corderos infestados por *Bovicola ovis* los niveles dérmicos de esta citoquina eran significativamente superiores a los no infestados (Shu y col., 2009).

Al igual que sucedió con la IL-4, la expulsión de los adultos de *Trichinella* del intestino se asocia con una mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th 2 que se manifiesta con una secreción importante de citoquinas en concreto IL-4, IL-10 y IL-13 (Helmby y col., 2003).

4.3.3.5.- INTERLEUQUINA 12 (IL-12)

La interleuquina 12 es una citoquina derivada de las células B y ha sido descrita como el factor estimulador de las células asesinas naturales. Esta proteína es un heterodímero con una actividad muy pleiotrópica que incluye la inducción de la secreción de IFN-γ por parte de las células asesinas naturales.

La evolución de esta citoquina a lo largo del estudio queda reflejada en la gráfica siguiente:

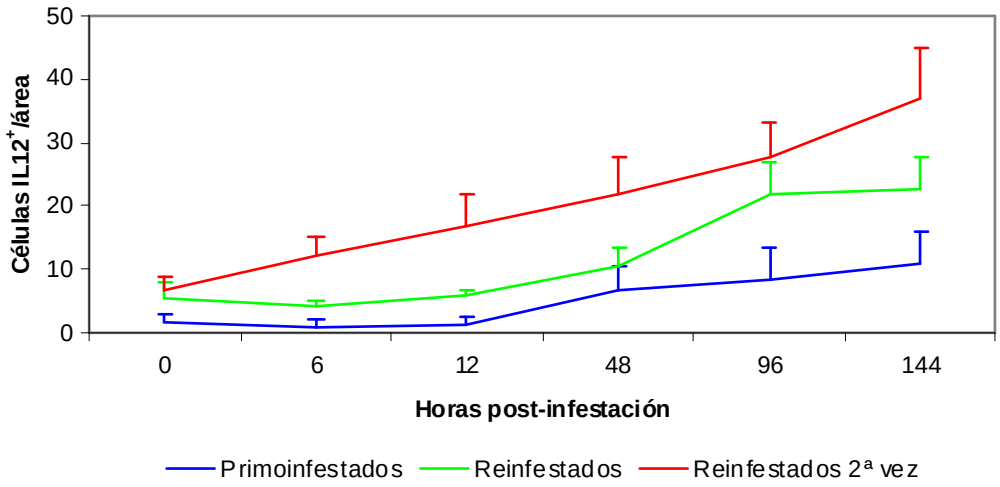


Figura 2.12.- Evolución del número de células IL-12^{+} a nivel dérmico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados**, el número de células marcadas fue muy reducido hasta las 12 h.p.i, y a partir de este momento aumentaron ligeramente hasta el final del estudio (10,75±5,25 células IL-12^{+}/área).

En los **animales reinfestados por 1ª vez** constatamos una evolución similar al grupo primoinfestado, si bien el número medio de células marcadas fue mayor.

Finalmente, los **animales reinfestados por 2ª vez** presentaron un aumento progresivo a lo largo del estudio con valores máximos a las 144 h.p.i. (36,75±8,26 células IL-12^{+}/área).

De esta forma se comprueba que en las reinfestaciones por *Hypoderma lineatum* existe mayor expresión de esta citoquina a nivel dérmico con respecto a los animales primoinfestados.

El análisis de varianza de muestras repetidas (contraste diferencia) indicó que el número de células IL-12^{+} en los animales primoinfestados no varió de forma significativa con respecto a muestreos anteriores hasta las 48 (F= 13,364; *P*= 0,035), 96 h.p.i. (F= 24,000; *P*= 0,016) y 144 h.p.i (F= 81,000; *P*= 0,003). En los animales reinfestados, el número de células marcadas se incrementó significativamente a las 12 h.p.i (F= 24,000; *P*= 0,016) y a las 96 h.p.i (F= 75,571; *P*= 0,003), mientras que en los animales reinfestados por 2ª vez, ya se produjo un aumento significativo a las 6 h.p.i. (F= 27,923; *P*= 0,013), que se prolongó a lo largo del estudio, 12 h.p.i (F= 25,000; *P*= 0,015), 48 h.p.i. (F= 18,356; *P*= 0,023), 96 h.p.i. (F= 16,615; *P*= 0,027) y 144 h.p.i. (F= 18,000; *P*= 0,024).

El contraste simple mostró diferencias significativas entre el número de células marcadas en los diferentes grupos de animales a las 6 h.p.i. (F= 7,853; *P*= 0,011) y 12 h.p.i. (F= 10,012; *P*= 0,005) y 96 h.p.i. (F= 7,853; *P*= 0,011). Con la técnica posthoc Bonferroni se observó que las diferencias se producían entre el grupo G-3 frente a G-1 (*P*= 0,032) y G-2 (*P*= 0,017) en las tomas a las 6 h.p.i. En la toma 12 h.p.i. el G-3 se eleva de nuevo significativamente sobre el grupo G-1 (*P*= 0,005); sin embargo, en la toma 96 h.p.i. fue el G-2 el que aumenta significativamente más que el G-1 (*P*= 0,005).

En cuanto a la distribución, las células marcadas, de tamaño grande se localizaron de forma aislada en toda la dermis superficial, mientras que en la dermis profunda apenas se observaron.

Son muy pocos los estudios que hacen un seguimiento de esta interleuquina a nivel cutáneo. En la infestación por garrapatas, Ferreira y Silva (1999) no solo no hallaron ningún incremento en esta citoquina, sino que su expresión se inhibía de forma significativa. De forma similar, D' Andrea y col. (1993) también observaron una reducción de la IL-12 debida probablemente a una producción elevada de IL-10 y de IL-4. De esta forma la IL-10 junto con la IL-4 suprimiría la síntesis de la IL-12.

4.3.4.- NIVELES SÉRICOS DE CITOQUINAS DURANTE LAS FASES INICIALES DE LA INFESTACIÓN POR *H. lineatum*

Tras el estímulo antigénico ejercido por la penetración de las L-1 de *Hypoderma lineatum* se secretan diferentes interleuquinas a nivel local que pasan a los plexos vasculares de la dermis superficial y que son distribuidas vía sistémica por la circulación sanguínea, actuando como una señal inicial que indica daño en la piel y que activa el sistema inmune (Salmon y col., 1994).

4.3.4.1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α (TNF-α)

La evolución de la concentración sérica de esta citoquina durante la fase de penetración larvaria aparece reflejada en la figura 2.13.

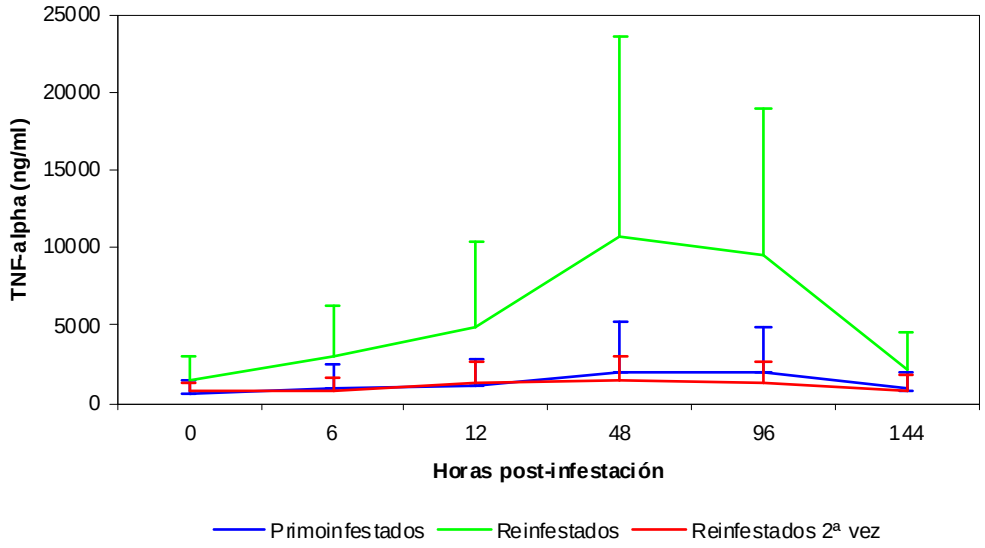


Figura 2.13.- Evolución de la concentración de TNF-α a nivel sistémico en los tres grupos de animales

En el suero de los animales primoinfestados y reinfestados, la concentración de TNF-α fue bastante reducida a lo largo del estudio y no mostró oscilaciones importantes. Por el contrario, en los animales reinfestados por 2ª vez, se observaron niveles mucho más elevados que se incrementaron desde el inicio de la penetración larvaria, alcanzando el máximo a las 48 h.p.i. (10692,44 ± 12867,40).

A pesar de estas diferencias, el análisis de varianza de muestras repetidas no indicó diferencias significativas en las concentraciones de esta citoquina a lo largo del tiempo ni entre los diferentes grupos de animales, debido a la gran variabilidad en los niveles de TNF- α en los animales del grupo 2.

Esta citoquina juega un papel importante en la protección frente a aquellas parasitosis en las que se desarrolla una respuesta inmunitaria de tipo Th1. Así, Wei y col. (2006) encontraron que esta citoquina interviene muy activamente en la toxoplasmosis, de forma que por ejemplo, en los ratones vacunados su concentración en suero y en cultivos celulares de bazo fue elevada. En este caso se vio que el 88,9%

de los ratones vacunados desarrollaban una respuesta eficiente a las 180 h.p.i. y tenían una supervivencia significativamente superior.

En el caso de la infección por *Leishmania* spp., Alves y col. (2008) demostraron que los animales infectados que no mostraban síntomas presentaban niveles elevados de IFN-γ y de TNF-α, lo cual indicaba que estas dos citoquinas desempeñaban un papel importante en la protección contra la infección. De la misma forma, Zintl y col. (2005) demostraron que las infecciones por *Babesia bovis* parecían estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN-γ y TNF-α.

Menard y col. (2008) observaron que en ratones infectados por *Toxoplasma* sp el TNF-α expresado en la superficie de las células B aumentaba la expresión del IFN-γ por las células T.

Schnittger y col. (2000) en ovejas y cabras infestadas por *Theileria annulata* comprobaron que las células afectadas por esta parasitación expresan un mayor nivel de TNF-α, mientras que otras citoquinas como el IFN-γ y la IL-4 estaban menos representadas.

No obstante, en otras trematodosis como la originada por *Fasciola hepatica,* Gironés y col. (2007) infectando ratas con metacercarias comprobaron que no existía ninguna diferencia significativa en la secreción de TNF-α, si lo comparaban con las ratas control sin infectar.

4.3.4.2.- INTERFERÓN GAMMA (IFN-γ)

Como puede observarse en la figura 2.14, la secrección de IFN-γ en los diferentes grupos de animales durante la penetración por larvas 1 de *Hypoderma lineatum* fue baja, con concentraciones de la citoquina inferiores a 200 ng/ml.

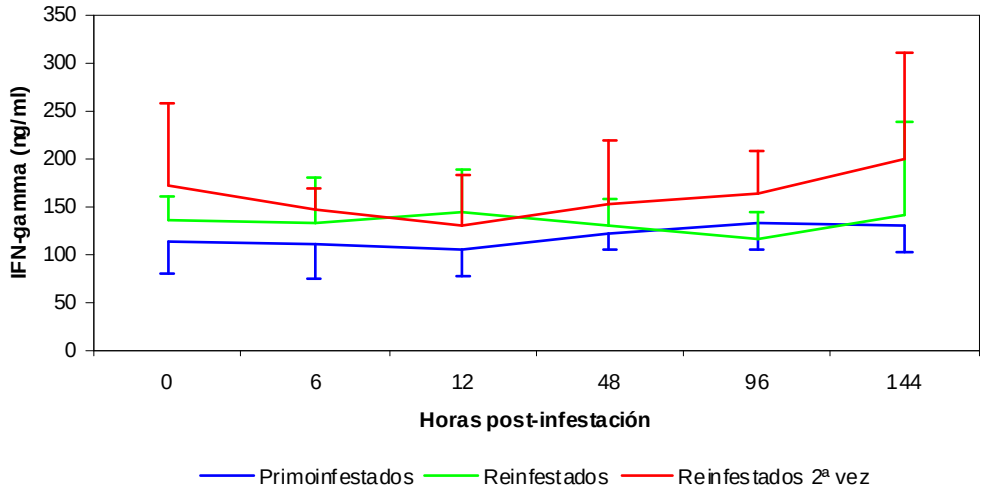


Figura 2.14.- Evolución de la concentración de IFN-γ a nivel sistémico en los tres grupos de animales

En la figura 2.14 se aprecia como tanto las primo como reinfestaciones experimentales por L-1 de *H. lineatum* no poseen un efecto significativo en las concentraciones de esta citoquina, puesto que éstas permanecieron constantes y sin grandes oscilaciones a lo largo del estudio.

El análisis de varianza de muestras repetidas ANOVA indicó que la concentración de esta citoquina en el suero de los diferentes animales no experimentaba variaciones significativas y tampoco se observaron diferencias entre las concentraciones de los distintos grupos.

De acuerdo con estos resultados, la infestación por *H. lineatum* no ejercen un efecto significativo en las concentraciones de IFN-γ en sangre. Por el contrario, en algunas protozoosis, la acción de esta molécula es vital para superar la infección. Así, por ejemplo en la leishmaniasis, la concentración de esta citoquina en el suero de los animales constituye una defensa muy importante, así en opinión de Fong y Mosmann (1990) y Muller y col. (1994) las células T citotóxicas producen concentraciones

elevadas de IFN-γ que juegan un papel decisivo en la activación de los macrófagos para la destrucción de *Leishmania*. La implicación de esta interleuquina en la protección frente a esta enfermedad también fue comprobada por Alves y col. (2008) al observar que perros asintomáticos presentaban niveles elevados de IFN-γ y de TNF-α.

Del mismo modo, en la babesiosis el IFN-γ es vital en la respuesta Th1 durante la infección por *Babesia bovis* (Goff y col., 2003). Zintl y col. (2005) también observaron que las infecciones por *Babesia bovis* parecen estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN-γ y TNF-α.

Patterson y col. (1999) al inmunizar ratones con el antígeno de *Plasmodium* spp constataron niveles elevados de IFN-γ en el suero. Además comprobaron que una respuesta prolongada del IFN-γ se asociaba a un aumento de la supervivencia de los ratones infectados.

Abou-Bacar y col. (2003) y Rozenfield y col. (2005) apreciaron que la inmunidad protectora en ratones infectados con *T. gondii* estaba mediada principalmente por citoquinas secretadas en la respuesta Th1 y de forma especial por el IFN-γ.

En otros parásitos como los helmintos, esta citoquina parece ser menos importante. Así, Claerebout y col. (2005), al estudiar la secreción de citoquinas en terneros infectados e inmunizados con fracciones de larvas 3 de *Ostertagia ostertagi*, observaron que después de la infección se producía una disminución en la respuesta Th1 (IFN-γ e IL-12). Por otra parte, Clery y col. (1996) comprobaron en un grupo de terneros con fasciolosis crónica natural y en otro lote de terneros reinfectados experimentalmente que no se detectaba IFN-γ y concluyeron que, puesto que la infección se había establecido con éxito, se trataba de una respuesta linfocitaria no protectora de tipo Th2. Esta hipótesis ya había sido sugerida con anterioridad por Poitou y col. (1993). Además, Poitou y col. (1993) y Clery y col. (1996) señalaron que en el caso de fasciolosis crónicas, el hospedador limita su respuesta inmune con objeto de reducir las lesiones tisulares y limitar la extensión de la infección mediante una respuesta de tipo Th2. Chevillard y col. (2003) en la parasitosis por *Schistosoma mansoni* comprobaron que los productos de excreción-secreción, se regulaban por la secreción de diferentes citoquinas, entre las cuales estaba el IFN-γ. También vieron que niveles altos de IFN-γ se relacionaban con una reducción notable del riesgo de

fibrosis hepática. Por otra parte, la cinética del IFN-γ y de la IL-10 mostraba que la respuesta protectora se regulaba por las citoquinas tipo Th1 en fases tempranas de la infección. Estas observaciones demostraron que esta citoquina posee propiedades antifibrogénicas y profibrolíticas, inhibiendo la diferenciación de ciertas células y la producción de colágeno por los fibroblastos. Además también se comprobó que inhibía la activación de los lipocitos en el hígado dañado.

4.3.4.3.- INTERLEUQUINA 10 (IL-10)

En la figura 2.15 aparece representada la evolución de los niveles séricos de interleuquina 10. Hemos de señalar que, debido a la falta de IL-10 para realizar la curva patrón, no se pudo calcular su concentración por lo que sus valores aparecen representamos como los valores de absorbancia a 450 nm.

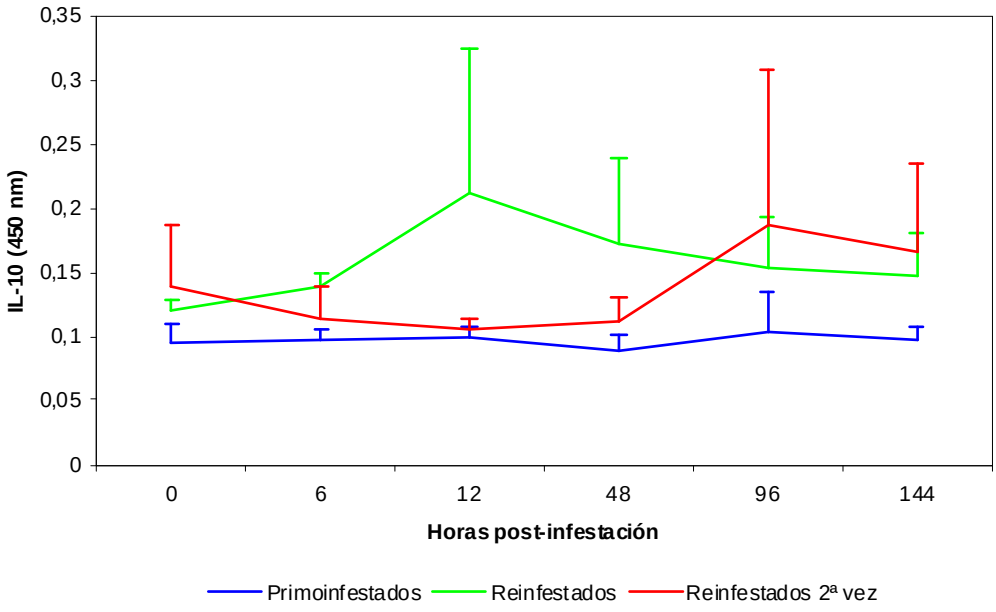


Figura 2.15.- Evolución de la concentración de IL-10 a nivel sistémico en los tres grupos de animales

Al analizar la evolución de esta interleuquina se vio que en los **animales primoinfestados** los niveles de DO fueron bajos y constantes a lo largo del estudio. Por el contrario, en los **animales reinfestados por 1ª vez,** los niveles de IL-10 mostraron un máximo a las 12 h.p.i. y en los **reinfestados por 2ª vez** a las 96 h.p.i. Mediante el análisis de los resultados por contraste repetido no se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo en los distintos grupos de animales, de

tal forma que se mantiene un nivel bastante constante hasta las 48 h.p.i., a partir de este punto la densidad óptica llega a un máximo a las 96 h.p.i. (0,154 ± 0,039) y se mantiene casi constante hasta las 144 h.p.i.

No obstante, el contraste simple mostró diferencias entre los grupos a las 12 h.p.i. (F= 6.360; *P*= 0.019). Mediante análisis posthoc Bonferroni se observó que esas diferencias se correspondían a un aumento significativo del G-2 frente al G-3 (*P*= 0,019).

En la hipodermosis, Panadero y col. (2009) comprobaron que la adición del antígeno somático a cultivos linfocitarios inducía una supresión de la producción de IFN-γ, IL-10 e IL-4, mientras que la adición de la hipodermina A aumentaba la secreción de IFN-γ y suprimía la de IL-10. Estos autores demostraron que por separado cada una de las tres hipoderminas secretadas por las L-1 de *Hypoderma* poseen efecto inmunomodulador suficiente pero que se solapa parcialmente.

En las miasis provocadas por *Lucilia cuprina*, Elhay y col. (1994) detectaron a nivel dérmico un aumento de la IL-10 a las 6 horas post-infestación.

En otras ectoparasitosis como las causadas por garrapatas, Kopecky y col. (1999) demostraron que la inyección de un antígeno de la saliva de *Ixodes ricinus* aumentaba la secreción de IL-10, lo cual podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de las secreciones salivales de la garrapata. Del mismo modo, Ferreira y Silva (1998) al cultivar las células linfáticas de ratones parasitados en presencia del mitógeno Con A, expresaban un perfil Th2, representado por el aumento de la secreción de IL-4 e IL-10.

Al analizar el papel de esta interleuquina en otras parasitosis, comprobamos que en el caso de los protozoos y en concreto de *Leishmania* spp, Alves y col. (2008) observaron que la expresión de la IL-10 fue significativamente superior en los ratones que manifestaban síntomas clínicos de la enfermedad. En el caso de los protozoos hemáticos, Goff y col. (2003) demostraron que al superar la enfermedad los animales ya no mostraban una reacción tipo Th1 y aparecían niveles de IL-10 que se mantenían durante periodos prolongados.

En parásitos más evolucionados como *Trichinella spiralis,* Helmby y Grencis (2003) observaron que la expulsión de adultos del intestino se asociaba con una

mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th2 que se manifiesta con una abundante secreción de IL-10. En la toxocariosis, Torina y col. (2005) observaron que la concentración de IL-10 aumentaba durante la gestación en los animales parasitados.

En la fasciolosis, Gironés y col. (2007) afirman que esta citoquina también ejerce una importante función, al observar en ratas un predominio de la respuesta Th2 en las semanas 7, 10 y 20 con respecto a las citoquinas de tipo Th1. De esta forma, estos autores detectaron que los niveles de la IL-10 eran más elevados en las ratas parasitadas 7 semanas después de la infección y posteriormente, a las 10 y 20 semanas observaron una disminución de esta interleuquina. En otros trematodos como *Schistosoma* spp, Sher, (1992) afirman que la IL-10 también desempeña un papel fundamental en el inicio de la infección y posteriormente se sustituye por una respuesta no protectora de tipo Th2.

4.3.4.4.- INTERLEUQUINA 4 (IL-4)

Como puede observarse en la figura 2.16, durante la penetración por larvas 1 de *Hypoderma lineatum* la evolución de las concentraciones séricas de la IL-4 en los diferentes grupos de animales fueron bajas, con valores inferiores a 125 ng/ml.

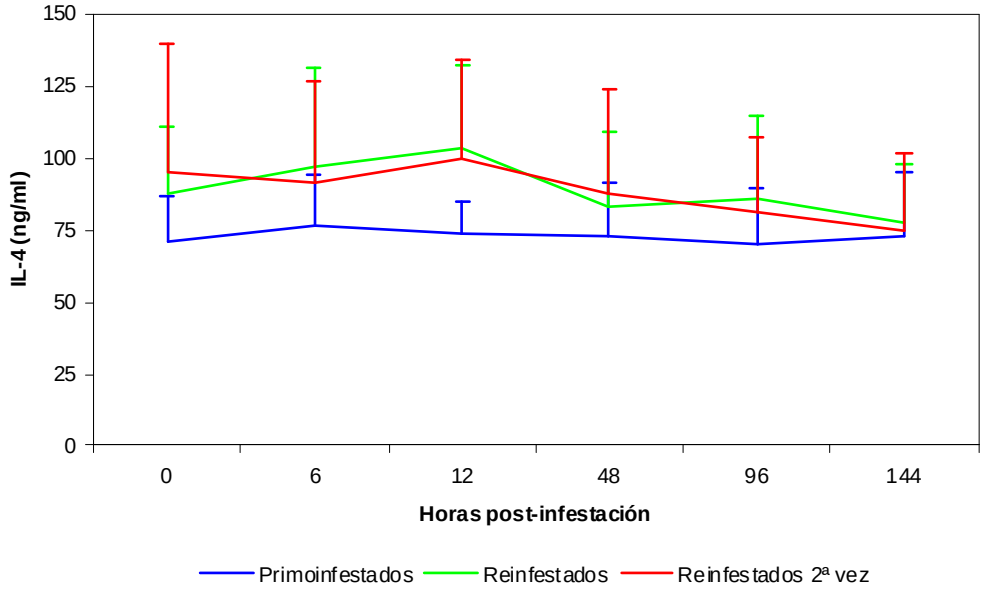


Figura 2.16.- Evolución de la concentración de IL-4 a nivel sistémico en los tres grupos de animales

En los **animales primoinfestados** la concentración de esta interleuquina aumentó de forma significativa a las 6 h.p.i. (F= 26,854; *P*= 0,014) con respecto a los valores preinfestación. A partir de este momento los valores permanecieron relativamente constantes. En los animales **reinfestados por 1ª vez** las concentraciones de IL-4 mostraron un descenso significativo entre las 12 y las 48 h.p.i. (F= 9,936; *P*= 0,05). Finalmente, en los **animales reinfestados por 2ª vez** la infestación no tuvo ningún efecto significativo sobre las concentraciones de IL-4.

La prueba de contraste simple no indicó diferencias significativas entre los distintos grupos.

En la miasis provocada por *Lucilia sericata,* Elhay y col. (1994) destacan la ausencia de IL-4 en todos los animales parasitados.

En la infestación por garrapatas, Ferreira y Silva (1998) en un cultivo de células linfáticas de ratones estimulándolas con un mitógeno comprueban el predominio de la respuesta Th2 representado por el aumento de la IL-4.

Gironés y col. (2007) en una infección experimental con *Fasciola hepatica* en ratas, comprobaron que los niveles de IL-4 a las 7 semanas después de la infección eran más altos en las ratas parasitadas que en las testigo. Posteriormente, a las 10 y 20 semanas observaron una disminución de esta citoquina y en la semana 20 no encontraron diferencias en la secreción de las interleuquinas estudiadas. No obstante, observaron una correlación negativa significativa entre el nivel de IL-4 y la eliminación de huevos a las 7 y 10 semanas post-infección.

4.3.4.5.- INTERLEUQUINA 12 (IL-12)

Al igual que sucedió con la IL-10, debido a la ausencia de un patrón apropiado para llevar a cabo el cálculo de la concentración de esta citoquina en el suero, sus niveles aparecen reflejados directamente como valores de absorbancia a 450 nm.

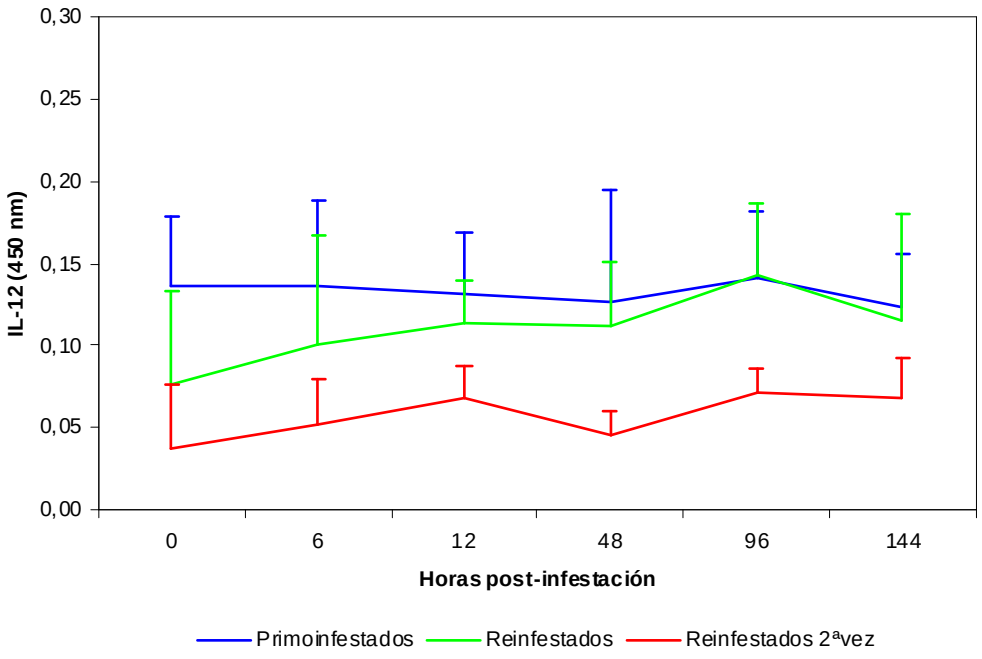


Figura 2.17.- Evolución de la concentración de IL-12 sistémica en los tres grupos de animales

Como se puede apreciar en la figura 2.17, los **animales primoinfestados** presentaron valores de absorbancia bastante constantes durante el estudio. En el grupo de los **animales reinfestados**, al inicio de la penetración larvaria se constata un valor muy bajo para incrementarse después, alcanzando un máximo a las 96 h.p.i., tal como sucedía en los anteriores. A partir de este momento, el nivel de esta interleuquina en suero desciende hasta las 144 h.p.i. Cabe destacar el hecho de que el grupo **reinfestado por 2ª vez** presentó los valores de DO más bajos.

Mediante el análisis de varianza de muestras repetidas con contrate repetido se observó que en el grupo reinfestado por primera vez (G-2) a las 6 h.p.i. se producía un incremento significativo de la IL-10 en suero ($F= 434,262$, $p\leq 0,001$). Posteriormente los valores de IL-10 en el G-2 se mantienen más o menos estables sin variaciones estadísticamente significativas para aumentar de nuevo de forma significativa a las 96 h.p.i. Ni el grupo G-1 primoinfestado ni G-3 reinfestado por segunda vez, mostraron cambios significativos a lo largo del tiempo de seguimiento.

El contrate simple del análisis de varianza de muestras repetidas ANOVA indicó diferencias entre los diferentes grupos de animales a las 6 h.p.i. ($F= 5,317$, $p= 0,030$). Mediante la técnica posthoc Bonferroni se pudo observar que esa diferencia suponía un aumento significativo del G-2 respecto al G-1.

En la infestación por garrapatas Ferreira y Silva, (1999) no hallaron ningún incremento en esta citoquina, y además su expresión se inhibía de forma significativa y en los ganglios linfáticos de ratones parasitados por garrapatas. D' Andrea y col. (1993) también observaron una reducción de la IL-12 debida probablemente a una producción elevada de IL-10 y de IL-4. De esta forma la IL-10 junto con la IL-4 suprimiría la síntesis de la IL-12.

En la leishmaniosis, Sypek y col. (1993) señalan que las células NK, activadas por la IL-12 son la fuente principal de la secreción temprana de IFN-γ. Por otra parte, esta citoquina no sólo juega un importante papel en el control de la resistencia inicial en las infecciones por *L. major*, sino que también influye en el inicio de la diferenciación hacia Th1 en ratones resistentes (Scharton-Kersten y col., 1995).

En la toxoplasmosis, Wilson y col. (2008) comprobaron que la IL-12 desarrollaba un papel decisivo no sólo en la inducción de la expresión del IFN-γ sino también en la diferenciación de células T CD8 en respuesta a este protozoo.

En la parasitación por *Ostertagia ostertagi*, Claerebout y col. (2005) afirman que después de la infección, existe una disminución en la respuesta Th-1 (IFN-γ e IL-12) y un incremento de la respuesta Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). En la triquinelosis, Helmby y col. (2003) concluyeron que la IL-12 regula la proliferación de los mastocitos, independientemente del IFN-γ. Más recientemente, Whan y col. (2005) infectaron ratones con este parásito y comprobaron que los niveles de esta citoquina disminuía en los días 7, 21 y 35 post-infección

4.3.5.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A NIVEL LOCAL Y SISTÉMICO

Al intentar relacionar la expresión local de citoquinas con sus niveles en sangre periférica, comprobamos que Test de correlación de Pearson solamente mostró una correlación positiva entre el número de células IL-10^{+} a las 12 h.p.i. y la concentración de esta citoquina en el suero a las 6 (R= 0,867; *P*= 0,000) 12 (R= 0,690; *P*= 0,013) y a las 48 h.p.i (R= 0,763; *P*= 0,004). Por el contrario, en las demás citoquinas estudiadas no se halló correlación entre sus respectivos niveles séricos y el número de células positivas en la dermis de las vacas infestadas experimentalmente.

De esta forma se pudo observar que, a excepción de la IL-10, no hubo correlación entre la respuesta a nivel local y las concentraciones séricas de las distintas citoquinas. Estos resultados sugieren que la determinación de las concentraciones séricas de estas citoquinas no reflejaría con exactitud la respuesta cutánea que tiene lugar durante la penetración de las larvas 1 de *H. lineatum*. En este caso, los ganglios linfáticos regionales también podrían desempeñar un papel importante en la producción de citoquinas que se liberarían a la circulación.

La evolución de células positivas a las diferentes interleuquinas, a lo largo del estudio fue similar en los diferentes grupos de animales, aunque la intensidad de la respuesta dependió del número de exposiciones anteriores al parásito. Además, en todos los grupos de animales se constató una elevación transitoria en el número de células positivas a las distintas citoquinas, pero una vez finalizada la penetración

cutánea, los recuentos disminuyeron alcanzando valores similares a los previos a la infestación.

En este estudio se ha observado que tanto la producción local como los niveles circulantes de las distintas citoquinas fueron, en general, más elevados tras repetidos contactos con las L-1 de *Hypoderma*. Esta falta de reactividad por parte de los animales primoinfestados es debida en opinión de diversos autores (Boulard, 1989; Chabaudie y Boulard, 1992, 1993; Nicolas-Gaulard y col., 1995; Panadero y col., 2009) a la actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de las hipoderminas larvarias, que se aprecia especialmente en ganado sin contactos previos con las larvas parásitas.

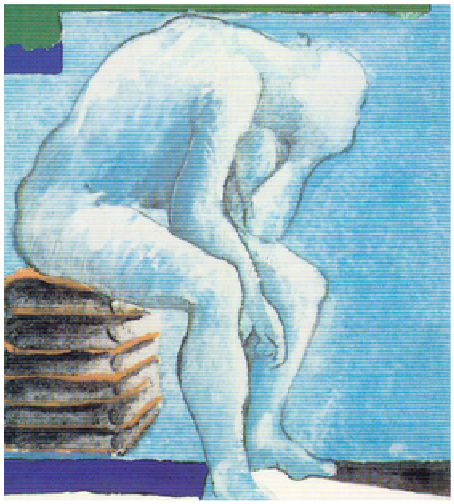
De acuerdo con nuestros resultados, se sugiere que la mayor supervivencia larvaria que tiene lugar en animales primoinfestados sea el resultado, al menos en parte, del efecto antiinflamatorio de las hipoderminas, que provocaría una respuesta rápida de la IL-10, que a su vez es la encargada de regular la producción de IFN-γ.

En los animales reinfestados la cinética del IFN-γ se caracteriza por un rápido incremento en el número de células positivas, seguido de un rápido descenso, mientras que la elevación del número de células positivas a la IL-10 es más lento con un nivel máximo a las 48 Pi. El nivel elevado IFN-γ y la reducida secreción de IL-10 durante la penetración de las larvas (6 Pi..) puede implicar la activación de los macrófagos en un intento de controlar las larvas 1 de manera eficiente. De hecho, de acuerdo con Torina y col. (2005), IL-10 podría inhibir la respuesta granulomatosa alrededor de las larvas a través de la inhibición del IFN-γ mediada por la activación de los macrófagos. El aumento de la respuesta Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-12) y Th2 (IL-4 e IL-10) indica que en la especie bovina las células T ejercen una respuesta importante durante las primeras fases de la infestación por *Hypoderma lineatum*, es decir, cuando las larvas están penetrando en la piel y empiezan a avanzar a través del tejido conectivo hacia el esófago, lo que aparentemente es una respuesta Th0.

Es preciso señalar, que la polarización de la respuesta inmune es un proceso dinámico que puede variar a lo largo de las diferentes fases de desarrollo del parásito dentro del hospedador (Estes y Brown, 2002), por lo que, para poder llegar a definir bien los mecanismos inmunológicos que determinan la resistencia frente a *Hypoderma* spp, sería necesario también estudiar la respuesta celular y la producción de citoquinas en las fases posteriores de desarrollo del parásito, especialmente durante

su permanencia en la submucosa esofágica y después de su llegada al tejido subcutáneo del dorso.

Conclusiones



De los resultados obtenidos en los diferentes apartados de este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- En las vacas primoinfestadas la penetración de las larvas de *H. lineatum* a través de la piel genera un infiltrado inflamatorio de escasa intensidad, mientras que en las reinfestadas esta respuesta es mucho más intensa y además aumenta a medida que se suceden las infestaciones, lo que explicaría, al menos en parte, la mayor mortalidad larvaria que tiene lugar en las reinfestaciones.

2.- La respuesta eosinofílica en los animales reinfestados también fue más intensa, confirmando que la participación de estas células en la reacción cutánea producida frente a la penetración de las larvas requiere una exposición previa al parásito.

3.- En la piel del ganado vacuno primoinfestado por *H. lineatum* existe un predominio de linfocitos T frente a los B, mientras que en el caso de reinfestaciones, el aumento de linfocitos B es más pronunciado, lo que indica que estos animales generan una respuesta de memoria específica frente a infestaciones posteriores.

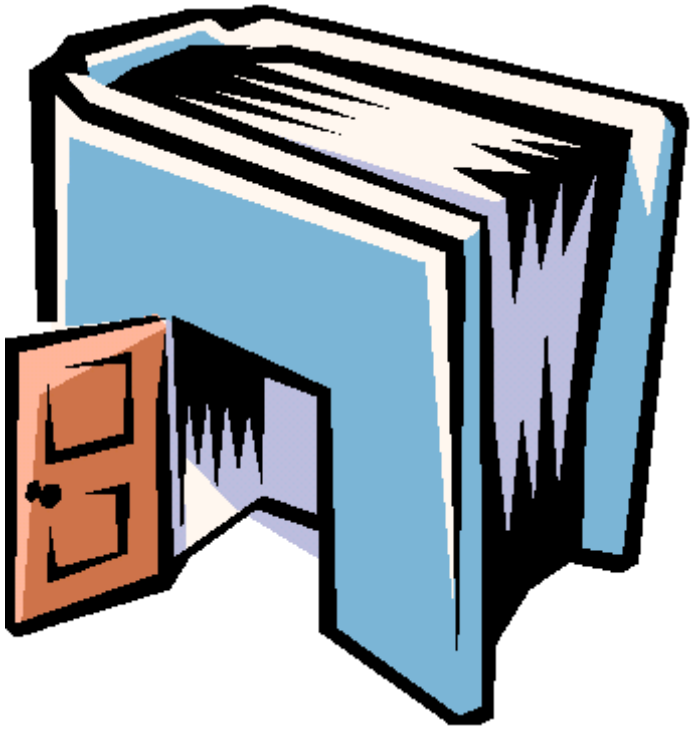
4.- El número de linfocitos CD4 y CD8 fue muy similar en los animales primo y reinfestados durante las primeras fases de la infestación por *H. lineatum*, apreciándose en todos ellos un predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos.

5.- El incremento de citoquinas de tipo Th1 (IFN-γ, TNF-α) y de tipo Th2 (IL-4, IL-10) sugiere que la respuesta celular bovina durante las primeras fases de la infestación es aparentemente de tipo mixto o Th0. Durante esta fase, no existe una correlación entre la producción local dérmica y las concentraciones séricas de estas citoquinas.

6.- La elevación más tardía de los niveles de IL-10 en los animales reinfestados sugiere que la respuesta inflamatoria y el daño tisular producido por las L-1 durante la penetración cutánea son más intensos en estos animales que en los primoinfestados.

7.- Al considerar los parámetros analizados en su conjunto, se observa que en los animales reinfestados por *H. lineatum* existe una respuesta de memoria importante, que aumenta a medida que el número de infestaciones se va sucediendo, y que vendría a significar una primera barrera defensiva frente a futuras reinfestaciones.

Resumen



Las larvas de *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) son parásitos obligados que atraviesan de forma activa la piel del hospedador y migran y se alimentan de sus tejidos, dejando tras de sí importantes lesiones. La piel está considerada como una barrera importante frente a las larvas 1 de *Hypoderma*, especialmente en animales previamente infestados.

Con los conocimientos actuales, la ausencia de relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia alcanzado por los animales, sugiere que la respuesta celular, que ha sido menos investigada hasta el momento, juega también un papel muy importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis.

Con el fin de esclarecer esta respuesta celular se realizaron dos ensayos. En el **primer ensayo** se emplearon 12 vacas de raza Holstein, que se distribuyeron en 3 grupos. El primer grupo estaba formado por 4 novillas que se mantuvieron como testigos sin infestar. Los otros dos grupos se infestaron experimentalmente, actuando como grupo primoinfestado y reinfestado por primera vez. La infestación se realizó con larvas 1 de *Hypoderma lineatum,* colocadas en 5 puntos de la piel del dorso. De cada uno de estos puntos se tomaron biopsias de piel a las 0, 6, 12, 48 y 96 h.p.i. Estas muestras se incluyeron en parafina para realizar un estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

En el estudio histopatológico de los animales testigo no se observó ninguna alteración aparente en la piel, ni tampoco se evidenció un incremento significativo en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas. En los animales primoinfestados se observó una ligera reacción inflamatoria entre las 6 y 96 h.p.i., y se apreciaron además, pequeñas escaras a nivel epidérmico. A las 48 h.p.i. la reacción cutánea se caracterizó por un infiltrado inflamatorio moderado en la dermis superficial. Este infiltrado estaba compuesto por células mononucleares y, ocasionalmente por polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos. En los animales reinfestados la respuesta celular en el área de penetración de las larvas fue mucho más intensa y extensa desde el comienzo de la reinfestación. Así a las 6 h.p.i., ya pudo observarse a nivel de la dermis superficial un infiltrado perivascular moderado que fue intensificándose hasta las 48-96 h.p.i. en las que la reacción inflamatoria cutánea fue mucho más intensa, afectando tanto a la dermis superficial como a la profunda e incluso a la hipodermis. Los eosinófilos fueron abundantes en el infiltrado a las 12 h.p.i., confirmando que su participación en la reacción cutánea frente a la penetración de las L-1 de *H. lineatum,* requiere la sensibilización previa frente al parásito.

Mediante inmunohistoquímica se observó que en los animales primoinfestados el número inicial de células T fue moderado, si bien fue aumentando progresivamente a lo largo del estudio mientras que en los reinfestados aumentó considerablemente a lo largo del estudio, con valores máximos a las 96 h.p.i. distribuyéndose uniformemente en la dermis superficial y profunda. Los linfocitos B en los testigos y primoinfestados se mantuvieron en niveles bajos y constantes a lo largo del estudio, mientras que en los reinfestados se incrementaron a partir de las 6 h.p.i., alcanzándose un máximo a las 48 h.p.i. Por último, las células plasmáticas siguieron una evolución similar a la de las células B.

Al realizar una comparación de ambas poblaciones linfocitarias, en el grupo primoinfestado los linfocitos T fueron mucho más abundantes que los linfocitos B mientras que en los animales reinfestados predominaban los linfocitos B. Al analizar la relación entre los linfocitos B y las células plasmáticas se observó que en las vacas primoinfestadas existía una correlación a las 12 h.p.i.

Para poder estudiar las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 y ver lo que sucedía tras sucesivas reinfestaciones de los animales, planteamos un **segundo ensayo** en el que las muestras se conservaron mediante congelación, se incluyó un grupo reinfestado y se amplió el muestreo hasta las 144 h.p.i. para evaluar el comportamiento de las diferentes poblaciones celulares una vez que las larvas ya han abandonado la piel y emprendido su migración hacia el esófago En este ensayo se incluyó, por lo tanto, un grupo primoinfestado, reinfestado por primera vez y un grupo reinfestado por segunda vez.

El estudio histopatológico mostró resultados muy similares a los del ensayo 1 para los animales primo y reinfestados por 1ª vez. Los animales reinfestados por 2ª vez presentaron una reacción más intensa en todas las capas dérmicas en comparación con los reinfestados por 1ª vez. La respuesta eosinofílica también fue mayor en las vacas reinfestadas por segunda vez con un máximo a las 96 h.p.i.

El análisis mediante inmunohistoquímica de las distintas poblaciones linfocitarias mostró que los linfocitos T seguían un comportamiento muy similar en los tres grupos, con un máximo a las 96 h.p.i. La mayor parte de estos linfocitos expresaban el receptor CD4, los cuales fueron más abundantes en los animales reinfestados por 2ª vez; sin embargo, los CD8 mostraron un comportamiento muy similar en los tres grupos.

Al igual que en el ensayo 1, la respuesta de los linfocitos B fue muy escasa en los animales primoinfestados, mientras que en los reinfestados por 1ª y 2ª el número de células marcadas se incrementó para alcanzar valor máximo a las 48 h.p.i. En este ensayo se amplió el estudio a los macrófagos y células del complejo principal de histocompatibilidad tipo II. No obstante, tenemos que señalar que no se hallaron macrófagos en las muestras observadas y, en cuanto a las segundas, los animales primoinfestados presentaron un mayor número.

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de la producción local (inmunohistoquímica) y los niveles séricos (ELISA sándwich) de las citoquinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-12. En general, el número de células marcadas fue reducido. En relación con el TNF-α en los animales primoinfestados y reinfestados por primera vez el número de células marcadas se incrementó desde el comienzo de la infestación hasta llegar a un máximo a las 48 h.p.i para posteriormente descender bruscamente hasta el final del estudio, sin embargo en los reinfestados por segunda vez se incrementó de forma más precoz.

Las células IFN-γ^+ mostraron un aumento significativo a las 6 h.p.i en los tres grupos de animales, seguido por un rápido descenso a las 12 y 48 h.p.i., en los reinfestados por 1ª y 2ª vez, respectivamente.

El número de células IL-10^+ se incrementó significativamente en los animales primoinfestados a las 6 y 48 h.p.i., mientras que en ambos grupos reinfestados este incremento se retrasó hasta las 12 h.p.i., alcanzando un pico a las 48 h.p.i.

El número de células IL-4^+ presentó un aumento significativo el grupo primoinfestado a las 6 h.p.i., mientras que en el grupo reinfestado por primera vez su número disminuyó de forma significativa a las 48 h.p.i.

Finalmente, con respecto a la IL-12 destacó el comportamiento de los animales reinfestados por 2ª vez mostrando un aumento progresivo a lo largo del estudio con valores máximos a las 96 h.p.i., momento en el que alcanza los valores del grupo G-1, que habían sido más elevados.

En cuanto a la distribución de las citoquinas, las células marcadas eran de un tamaño grande localizándose de forma aislada por toda la dermis superficial, mientras que en la dermis profunda apenas se observaron.

Por último, señalar que la penetración de las larvas 1 de *H. lineatum* a través de la piel no presentó ningún efecto significativo en las concentraciones séricas de IFN-γ y, excepto para la IL-10, no existe correlación entre la producción local y las concentraciones séricas de las distintas citoquinas. El incremento de conjunto de citoquinas de tipo Th1 (IFN-γ, TNF- α) y Th 2 (IL-4, IL-10) podría indicar que la respuesta durante las primeras fases de la infestación por Hypoderma es aparentemente de tipo Th0.

Bibliografía

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, S. J. (2002). Inmunología celular y molecular (cuarta edición). Ed Mc Graw-Hill, Interamericana.

ABDUL-AMIR, I.M.; GRAY, J.S. (1987). Resistance of sheep to laboratory infestations of the tick, *Ixodes ricinus*. *Research in Veterinary Science*, **43**: 266–267.

ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. (2003). Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infection and Immunity*, **72** (3):1397-401.

ABUL-HAK, J. (1973). Seasonal occurrence of *Hypoderma* spp*.* (Diptera: Oestridae) warble flies on cattle in Baghdad are, Iraq. *Bulletin of Endemic Diseases*, **14**: 73-81.

ALLEN, J.R. (1966). Passive transfer between experimental animals of hypersensitivity to *Aedes aegypti* bites. *Experimental Parasitology,* **19** (1):132-137.

ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. (2008). Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi. Veterinary Immunology and Immunopathology*, **15**: 349-358.

ANÓNIMO (1983). Erradication du varron en Bourgogne. Ed. Ministerio de Agricultura. Servicios Veterinarios del Consejo Regional de Borgoña; 22pp.

ARAUJO-CHAVERON, N. (1994). Etude d'*Hypoderma lineatum* (de Villers 1789): aspects épidemiologiques et interaction hôte-parasite. *Tesis Doctoral.* Universidad de Berna.

ARRU, E.; LEONI, A.; GARIPPA, G.; RASSU, A. (1985). Ipodermosi bovina: Localizacione stagionale delle larve e lesioni anatomo-patologiche. *Atti della Societá Italiana di Buiatria*, **17**: 697-707.

AUSTYN, J.M.; LARSEN, C.P. (1990). Migration patterns of dendritic leucocytes. Implications for transplantation. *Transplantation,* **49**: 1–7.

AUSTYN, J.M. (1992). Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. S*eminars in Immunology,* **4** (4):227-236.

BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1986). Immunization of cattle against hypodermatosis (*Hypoderma lineatum* (deVill.) and *H. bovis* (L.) using *H. lineatum* antigens. *Veterinary Parasitology*: **21** (1): 43-50.

BARON, R.W. (1987). Inhibition of the bovine response by warble grug infestations. *Research Highlights*, 42-44.

BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1987a). Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **21**: 43-50.

BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1987b). Immunological responses to parasitic arthropods. *Parasitology Today*, **3** (3):77-82.

BARON, R.W. (1990). Cleavage of purified bovine complement component C3 in larval *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) hypodermins. *Journal of Medical Entomology*, **27** (5): 899-904.

BARON, R.W.; COLWELL, D.D. (1991a). Mammalian immune responses to miasis. *Parasitology Today*, **7** (12): 353-355

BARON, R.W.; COLWELL, D.D. (1991b). Enhanced resistance to the grub infestation *(Hypoderma lineatum de Vill.)* in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). *Veterinary Parasitology*, **38**: 185-197.

BARQUET, P.; CHABAUDIE, N.; NICOLAS, I.; BOULARD, C. (1992). Action des hypodermines sur la migration et l'expression des neutrophiles bovins. *Journées d'animation scientifique, INRA, Maisons-Alfort.*

BARRETT, C.C. (1981). A new technique for collecting cattle grub larvae. *The Southwestern Entomologist*, **6**: 144-146.

BEESLEY, W.N. (1962). Observations on the development fo *Hypoderma bovis* De Geer (Diptera, Oestridae) in the bovine host. *Research in Veterinary Science*, **3**: 203-208.

BEESLEY, W.N. (1966). Further observations on the development of *Hypoderma lineatum, Villiers and Hypoderma bovis, de Geer (Diptera: Oestridae)* in the bovine host. British *Veterinary Journal*, **122**: 91-98.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology*, **165** (2): 969-977.

BELLWORTHY, S.; GROVES, B.; BATES, P. (1997). Clinical complications of sheep scab and the effect of corticosteroids on clinical signs and lesion development. *Proceedings of the Sheep Veterinary Society*, **21**: 107–112.

BENAKHLA, A.; BOULARD, C.; SEDRAQUI, S.; OUSSAID, F. (1993). L'hypodermose bovine: approche épidémiologique et caractérisation du cycle biologique en vue de l'établissement d'un plan de profilaxie dans le nord est Algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **144**: 693-700.

BENJAMINI, E.; FEINGOLD, B.F. (1970). Immunity to arthropods. In Jackson GJ, Herman R, Singer I (Eds.). *Immunity to Parasitic Animals (Appleton-Century-Crofts, New York),* pp. 1061–1034.

BERKENKAMP, S.D.; DRUMMOND, R.O. (1990). Hypodermosis-part I + part II. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, **12**: 740-746 + 881-888.

BISHOPP, F.C.; LAAKE, E.W.; BRUNDRETT, H.M.; WELLS, R.W. (1926). The cattle grubs or Ox warbles, their biologies and suggestions for control. U.S. *Department of Agriculture Bulletin*, **1359**: 119.

BOPPANA, D.K.; DHINAKAR, R.A.J.G.; JOHN, L.; WIKEL, S.K.; LATHA, B.R.; GOMATHINAYAGAM, S. (2004). In vivo immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes. *Parasite Immunology*, **26** (2): 83-93.

BORCHERT, A. (1964). Parasitología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza: 548-571.

BOROS, D.L.; WHITFIELD, J.R. (1998). Endogenous IL-10 regulates IFN-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*-infected mice. Immunology, **94** (4): 481-487.

BOS, J.A.; KAPSENBERG, M.L. (1986). The skin immune system Its cellular constituents and their interactions. *Immunology Today*, **7**: 235-240.

BOS J.D.; KAPSENBERG M.L. (1993).The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunology Today*, **14** (2): 75-78.

BOULARD, C. (1968). Différenciation et dévelopment des gonades mâles et femelles chez les larves d'*Hypoderma lineatum*. *Annales de la Societé Entomologique Française (new series)*, **5** (2): 349-364.

BOULARD, C. (1969). Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d'Hypoderma *bovis (Diptères, Oestriformes)*. *Annales de la Societé Entomologique Française (new series)*, **5** (2): 371-387.

BOULARD, C. (1970). Etude préliminaire d'une collagénase brute extraite de la larve de premier stade d'*Hypoderma lineatum* (De Villers). *Compte Rendu de l´Académie des Sciences*, Paris, **270**: 1349-1351.

BOULARD, C.; SORIA, J.; SORIA, C. (1970). Possibility to use passive hemagglutination test for diagnosis of hypodermyiasis, using as antigen a raw collagenase extracted from 1st stage larvae of *Hypoderma lineatum*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles*, **270** (15): 1965-1968.

BOULARD, C.; WEINTRAUB, J. (1973). Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae). *International Journal for Parasitolology*, **3**: 379-386.

BOULARD, C. (1975). Modifications histologiques de la sous-muqueuse oesophagienne de bovins parasités par *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera Oestriforme). *Annales de Recherche Vétérinaire,* **6** (2):131-142.

BOULARD, C.; GARRONE, R. (1978). Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera, Oestriform). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **59b**: 251-255.

BOULARD, C. (1979). Circulating antibodies and blood histamine in cattle after treatment against hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **5**: 379-387.

BOULARD, C.; LECROISEY, A. (1982). Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein. *Journal of Immunological Methods,* **50**: 221-226.

BOULARD, C. (1984). Effect of dose and route of application on the action of decametrin against cattle grubs. *Veterinary Parasitology*, **14**: 65-74.

BOULARD, C.; BENCHARIF, F. (1984). Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* (insect oestridae) larval proteinases in naive and immune cattle. *Parasite Immunology*, **6** (5): 459-467.

BOULARD, C. (1985). Avantages de l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine établi par hemaglutination passive et par ELISA à partir du sérum et du lactosérum sur la numération des varrons*. Annales de Recherche Vétérinaire*, **16**: 335-343.

BOULARD, C.; ARGENTE, G.; HILLION, E. (1988a). Hypodermose bovine. 1^{e} partie: description et incidence économique. *Le Point Vétérinaire*, **20** (111): 17-27.

BOULARD, C.; ARGENTÉ, G.; HILLION, E. (1988b). Hypodermose bovine: 2^{e} partie: diagnostic et traitement. *Le Point Vétérinaire*, **20** (112): 17-27.

BOULARD, C. (1989). Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **20**: 387-398.

BOULARD, C.; ARGENTE, G.; HILLION, E. (1991). Effects indésirables des antiparasitaires (hypersensibilité). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **167** (12): 1127-1132.

BOULARD, C.; VILLEJOUBERT, C. (1991). Use of pooled serum or milk samples for the epidemiogolical surveillance of bovine hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **39**: 171-183.

BOULARD, C.; BANTING, A.L.; CARDINAUD, B. (1998). Activity of moxidectin 1% injectable solution against first instar *Hypoderma* spp. in cattle and effects on antibody kinetics. *Veterinary Parasitology*, **77** (2-3): 205-210.

BOWLES, V.M.; GREY, S.T.; BRANDON, M.R. (1992). Cellular immune responses in the skin of sheep infected with larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *Veterinary Parasitology,* **44**: 151–162.

BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N.; CHANDLER, K.; VERHAGEN, A.; NASH, A.D., BRANDON, M.R. (1994). The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **40**: 341–352.

BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N.; YOUNG, A.R.; ANDREWS, A.E.; NASH, A.D.; BRANDON, M.R. (1996). Vaccination of sheep against larvae of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Vaccine*, **14** (14): 1347-1352.

BRAVERMAN, Y.; UNGAR-WARON, H.; FRITH, K.; ADLER, H.; DANIELI, Y.; BAKER, K.P.; QUINN, P.J. (1983). Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Veterinary Record*, **112** (22): 521-524.

BREEV, K.A. (1956). Borba s koznym ovodom v Zapadnoj Evrope i Amerike. *Veterinarija*, **33** (2): 78-83.

BREEV, K.A. (1971). On some common principes for control measures against parasitic arthropods (on the example of warble flies). *Entomology obozreniye*, **2**: 249-266.

BREEV, K.A.; ZAGRETDINOV, R.G.; MINAR, J. (1980). Influence of constant and variable temperatures on pupal development on the sheep bot fly (*Oestrus ovis L.*). *Folia Parasitologica*, **27**: 359-365

BROADMEADOW, M. (1984). Pathogenesis of blowfly strike in sheep. *Wool Technology* and *Sheep Breeding,* **32**: 28–32.

BROWN, S.J. (1982). Antibody- and cell-mediated immune resistance by guinea pigs to adult *Amblyomma americanum* ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* **31** (6): 1285-1290.

BROWN, S.J.; WORMS, M.J.; ASKENASE, P.W. (1983). *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. *Experimental Parasitology,* **55** (1): 111-120.

BUJDOSO, R.; HARKISS, G.; HOPKINS, J.; MCCONNELL, I. (1990). Afferent lymph dendritic cells: a model for antigen capture and presentation in vivo. *International Reviews of Immunology,* **6** (2-3): 177-186.

CASAIS, R.; MARTÍN ALONSO, J.M.; BOGA, J.A.; PARRA, F. (1998). *Hypoderma lineatum:* expression of enzymatically active hipodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Experimental Parasitology*, **90** (1): 14-19.

CASTRILLÓN, R.L.E.; PALMA, R.A.; PADILLA, D.C. (2007). Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Revista Mexicana de Dermatología*, **51** (2): 57-67.

CEPEDA-PALACIOS, R.; FRUGÈRE, S.; DORCHIES, P. (2000). Expected effects of reducing *Oestrus ovis L*. mature larval weight on adult populations. *Veterinary Parasitology*, **90** (3): 239-246.

CHABAUDIE, N.; VILLEJOUBERT, C.; BOULARD, C. (1991). The response of cattle vaccinated with hypodermin A to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *International Journal for Parasitology,* **21** (7): 859-862.

CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1992). Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **31** (1-2): 167-177.

CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1993). *In vitro* and *ex vivo* responses of bovine lymphocytes to hypodermin C, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **36**: 153-162.

CHAMBERLAIN, W.F. (1964). Survival of first-instar common cattle grubs under anaerobic conditions in vitro. *Annals of the Entomological Society of America*, **57**: 799-800.

CHAMBERLAIN, W.F. (1989). Survival of second and third instars of the cattle grubs, *Hypoderma lineatum (Villers)* and *Hypoderma bovis (L.)*, in artificial media. *The Southwestern Entomologist*, **14**: 233-239.

CHARBON, J.L.; PFISTER, K. (1992). Hypodermosis in Switzerland. Editado por: HERNÁNDEZ, S.; GASCA, A.; MARTÍNEZ, J.; PITHAN, J. Improvementes in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats, *Commision of the European Communities*, Córdoba: 45-50.

CHAUVIN, A. (1987). Application de la méthode immunoenzymatique ELISA au diagnostic de l'hypodermose bovine. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina de Nantes. 102 pp.

CHEVILLARD, C.; MOUKOKO, C.E.; ELWALI, N.E.; BREAM, J.H.; KOURIBA, B.; ANGIRO, L.; RAHOUD, S.; MERGANI, A. (2003). Interferon gamma polymorphisms are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). *Journal of Immunology*, **171** (10): 5596-5601.

CLAEREBOUT, E.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; OLBRECHTS, A.; ZARLENGA, D.S.; GODDEERIS, B.M.; VERCRUYSSE, J. (2005). Cytokine responses in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. *Parasite Immunology,* **27**: 325-331.

CLERY, D.; TORGERSON, P.; MULCAHY, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **62** (1-2): 71-82.

COGLEY, T.P.; ANDERSON, J.R. (1981). Invasion of black-tailed deer by mose bot fly larvae (Diptera: Gasterophilidae) in the equine oral cavity. *International Journal of Parasitology*, **12**: 473-480.

COLDITZ, I.G.; LAX, J.; MORTIMER, S.I.; CLARKE, R.A.; BEH, K.J. (1994). Cellular inflammatory responses in skin of sheep selected for resistance or susceptibility to fleece rot and fly strike. *Parasite Immunology*, **16** (6): 289-296.

COLDITZ, I.G.; EISEMANN C.H.; TELLAM, R.L.; MCCLURE, S.J.; MORTIMER, S.I.; HUSBAND, A.J. (1996). Growth of *Lucilia cuprina* larvae following treatment of sheep divergently selected for fleece rot and fly strike with monoclonal antibodies to T lymphocyte subsets and interferon gamma. *International Journal for Parasitology*, **26**(7): 775-782.

COLWELL, D.D. (1985). Cellular immunity in warble grub infestations: eosinophil responses to invading and migrating larvae. *Research Highlights*, **86**: 44-46.

COLWELL, D.D. (1987). Cellular immunity in warble grub infestations: Eosinophil responses to invading and migrating larvae. *Research Highlights Agriculture Canada Research Station*, Lethbridge, Alberta. *1985-86,* 44-46.

COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1988). Early detection of cattle grub infestations using ELISA technique*. Research highlights Agriculture Canada Research Station*, Lethbridge, Alberta. 28-29.

COLWELL, D.D. (1989). Scaning electron microscopy of the posterior spiracles of cattle grubs *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 391-398.

COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1990). Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera, Oestridae) using ELISA. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 35-42.

COLWELL, D.D. (1991). Ultrastructure of the integument of first-instar *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*: **28** (1): 86-94.

COLWELL, D.D.; BERRY, N.M. (1993). Tarsal sensilla of the warble flies *Hypoderma bovis* and H. lineatum (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **86** (6): 756-765.

COLWELL, D.D.; BARON, R.W.; LYSYK, T.J. (1997). Influence of parasiticide treatment on kinetics of antigens specific antibody response in cattle infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **68**: 117-186.

COLWELL, D.D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; DE LA FUENTE-LÓPEZ, C.; ALUNDA, J.M.; HALL, M.J. (1998). Comparative scanning electron microscopy of third-instar *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **12** (2): 181-186.

COLWELL, D.D. (2001). Stage specific mortality and humoral immune responses during pulse and trickle infestations of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology,* **99** (3): 231-239.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1962). Ensayos con “Neguvón” y “Trolene” sobre ganado vacuno. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, **VIII** (8): 11-37.

COX, D.D.; MOZIER, J.O.; MULLEE, M.T. (1970). Posterior paralysis in a calf caused by cattle grubs (*Hypoderma bovis*) after treatment with systemic insecticide for grub control. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **157** (8): 1088-1092.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**: 1041.

DAWSON, H.D.; BESHAH, E.; NISHI, S.; SOLANO-AGUILAR, G.; MORIMOTO, M.; ZHAO, A.; MADDEN, K.B.; LEDBETTER, T.K.; DUBEY, J.P.; SHEA-DONOHUE, T.; LUNNEY, J.K.; URBAN, J.F. (2005). Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infection and Immunity,* **73** (2): 1116-1128.

DAYNES, R.A.; SPANGRUDE, G.J.; ROBERTS, L.K.; KRUEGER, G.G. (1985) Regulation by the skin of lymphoid cell recirculation and localization properties. *Journal of Investigative Dermatology,* **85** : 14-20.

DE SMEDT, T.; VAN MECHELEN, M.; DE BECKER, G.; URBAIN, J.; LEO, O.; MOSER, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology*, **27** (5): 1229-1235.

DÍEZ, P.; PANADERO, R.; MORRONDO, P.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, N. (1995). Hipodermosis. *Bovis (Tratado de Veterinaria Práctica)*, **65**: 90 pp.

DOBY, J.M.; CERTAINES, J.; DEUNFF, J.; GUIGUEN, C.; AUVRAY, E. (1983). Hypodermose humaine et IgE sériques totales. Resultats de l'étude de plus de 125 sérums en provenance de 66 cas. *Médicine et Maladies Infectieuses*, **13** (3): 174-178.

DOBY, J.M.; QUILICI, M.; MARY, C.; DEUNFF, J. (1987). Valeur comparée de l'immunoélectrophorèse et de l'ELISA dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Pathologie and Biologie*, **35** (4): 381-385.

DORCHIES, P. (1997). Comparative physiopathology of *Oestrus ovis* (Linne 1761) myiasis in man and animals*. Bulletin de l'Académie Nationale de Medicine*, **181** (4): 673-683.

DURIN, L.; PÉRÈS, G. (1953). Lésions médullaires graves causées par des larves d'hypodermose sur un taureau. *Bulletin de la Societé des Sciences Vétérinaires de Lyon*, **1**: 111-112.

ELHAY, M.J.; HANRAHAN, C.F.; BOWLES, V.M.; SEOW, H.F.; ANDREWS, A.E.; NASH, A.D. (1994). Cytokine mRNA expression in skin in response to ectoparasite infection. *Parasite Immunology*, **16** (9): 451-461.

ESTES, D.M.; BROWN, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **90** (1-2): 1-10.

EVSTAF'EV, M.N. (1980). Role of immunity in hypodermyiasis in cattle. (1980). *Parazitologiia*, **14** (3): 197-205.

EYRE, P.; BOULARD, C.; DELINE, T.R. (1981). Reaginic (type I anaphylactic) antibodies produced by calves in responses to *Hypoderma* larvae. *The Veterinary Record*, **107**: 280-281.

FENG, C.G.; ZHENG, L.; JANKOVIC, D.; BÁFICA, A.; CANNONS, J.L.; WATFORD, W.T.; CHAUSSABEL, D.; HIENY, S.; CASPAR, P.; SCHWARTZBERG, P.L.; LENARDO, M.J.; SHER, A. (2008). The immunity-related GTPase Irgm1 promotes the expansion of activated CD4+ T cell populations by preventing interferon-gamma-induced cell death. *Nature Immunology*, **9** (11): 1279-1287.

FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **64** (3): 279-293.

FISHER, W.F.; PRUETT, J.H.; HOWARD, V.M.; SCHOLL, P.J. (1991). Antigen-specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *Hypoderma lineatum*-infested calves. *Veterinary Parasitology,* **40** (1-2): 135-145.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E.P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A.A.; SHENOY, A.S.; TERRAZAS, L.I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A.R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. (2008). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB Journal*, **22** (10): 3661-3671.

FLYNN, R.J.; MULCAHY, G. (2008). The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1673-1680.

FOLSTAD, Y.; NILSSEN, A.C.; HALVORSEN, O.; ANDERSEN, J. (1989). Why do male reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) have higher abundance of second and third instar larvae of *Hypoderma tarandi* than females. *Oikos*, **55**: 87-92.

FONG, T.A.; MOSMANN T.R. (1990). Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *Journal of Immunology*, **144**(5): 1744-1752.

FRANCART, J. (1978). *Étude des accidents consécutifs au traitement précoce de l´hypodermose bovine par les composés organophosphorés*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria Alfort: 95 pp.

GANZ, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology,* **3** (9): 710-720.

GIL-COLLADO, M. (1961). Insectos y ácaros de los animales domésticos. Edit. Salvat, Barcelona.

GINGRICH, R.E. (1970). Survival of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum* (Diptera:oestridae) implanted in heterologus murine hosts. *Jounal of Medical Entomology*, **7** (2): 256-260.

GINGRICH, R.E. (1980). Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **7**: 243-254.

GINGRICH, R.E. (1982). Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: Comparative immune response of resistant and susceptible cattle. *Veterinary Parasitology*, **9**: 233-242.

GIRONÈS, N.; VALERO, M.A.; GARCÍA-BODELÓN, M.A.; CHICO-CALERO, I.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M.; MAS-COMA, S. (2007). Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, **195** (10): 1504-1512.

GODON, C. (1994). Exploration de la migration des leucocytes de bovines au cours de la phase précoce d'une primoinfestation par les larves *d'Hypoderma lineatum*. Thèse pour le diplôme d'Etat. France, Université François Rabelais, 1994.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; HORN, R.H.; BARRINGTON, G.M.; KNOWLES, P.P. (2003). The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type 1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunology*, **25**: 185.

GRENCIS, R.K. (1997). Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences,* **352** (1359): 1377-1384.

GRUNER, L.; BOULARD, C. (1982). Climat et préventions du parasitisme animal. Actions du climat sur l'animal au pâturage, Ed. INRA, 185-199.

HADWEN, S.; FULTON, J.S. (1924). On the migration of *Hypoderma lineatum* from the skin to the gullet. *Parasitology*, **16**: 98-106.

HEIN, W.R.; MACKAY, C.R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunology Today*, **12** (1):30-34.

HEIN, W.R.; DUDLER, L. (1997). TCR gamma delta+ cells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. *Immunology,* **91** (1): 58-64.

HELMBY, H.; GRENCIS, R.K. (2003). IFN-gamma-independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. *Journal of Immunology*, **171** (7): 3691-3696.

HERBERT, D.R.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. (2002). The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite Immunology*, **24** (2): 95-101.

HIEPE, T.H.; RIBBECK, R.; GAHTOW, I.; GRAMANN, F.; HORST, J. (1969). Zur dynamik des befalls der rinder mit *Hypoderma bovis* De Geer, 1976. 2. mitteilung: vorkommen von larven I im wirbelkanal und lokalisation der dasselbeulen bei den rindern. *Sonderdruck aus, Monatshefte für Veterinärmedizin,* **8**: 289-293.

HUME, D.A.; ROBINSON, A.P.; MACPHERSON, G.G.; GORDON, S. (1983). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *The Journal of Experimental Medicine,* **158** (5):1522-1536.

HUNTLEY, J.F.; VAN DEN BROEK, A.; MACHELL, J.; MACKELLAR, A.; PETTIT, D.; MEIKLE, L.; BARCHAM, G.; MEEUSEN, E.N.; SMITH, D. (2005). The effect of immunosuppression with cyclosporin A on the development of sheep scab. *Veterinary Parasitology,* **127** (3-4): 323-332.

HURTADO, F. J. (1999). *Establecimiento de las bases epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de la hipodermosis bovina en Extremadura (España)*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 237 pp.

JACQUIET, P.; TRAN THI NGOC, T.; NOUVEL, X.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; YACOB, H.T.; BERGEAUD, J.P.; HOSTE, H.; DORCHIES, P.; TABOURET, G. (2005). Regulation of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naïve sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **105** (1-2): 95-103.

JOHNSON, D.R.; SALES, J.; MATTHEWS, J.B. (2005). Local cytokine responses in *Dictyocaulus viviparus* infection. *Veterinary Parasitology*, **128** (3-4): 309-318.

KANOBANA, K.; KOETS, A.; KOOYMAN, F.N.; BAKKER, N.; PLOEGER, H.W.; VERVELDE, L. (2003). B cells and antibody response in calves primary-infected or re-infected with *Cooperia oncophora*: influence of priming dose and host responder types. *International Journal for Parasitology*, **33** (13): 1487-1502.

KAPLAN, M.H.; WHITFIELD, J.R.; BOROS, D.L.; GRUSBY, M.J. (1998). Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *Journal of Immunology*, **160** (4): 1850-1856.

KARTER, A.J.; FOLSTAD, I.; ANDERSON, J.R. (1992). A biotic factors influencing embryonic development egg hatching and larval orientation in the reindeer warble fly *Hypoderma tarandi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**: 355-362.

KASTING, R.; McGINNIS, J.A. (1966). Amino acid requeriments of *Hypoderma bovis* (L.), determined with glucose-U14C. *Experimental Parasitology*, **19**: 249-253.

KAYE, P.M.; CURRY, A.J.; BLACKWELL, J.M. (1991). Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **146** (8): 2763-2770.

KENYON, F.; WELSH, M.; PARKINSON, J.; WHITTON, C.; BLAXTER, M.L.; KNOX, D.P. (2003). Expressed sequence tag survey of gene expression in the scab mite *Psoroptes ovis* allergens, proteases and free-radical scavengers. *Parasitology*, **126**: 451-460.

KETTLE, D.S. (1990). Medical and Veterinary Entomology. Ed. CAB International, 267-273.

KHAN, M.A. (1971). Some factors involved in systemic insectidice toxicosis: esophageal lesions in heifers treated with coumaphos, crufonate and tricholorfon. *Canadian Journal of Animal Science*, **51**: 411-417.

KHAN, M.A. (1981). An intradermal test to detect latent warble (*Hypoderma* spp.) infection in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, **22**: 36-41.

KHAZNADJI, E.; BOULARD, C.; MOIRÉ, N. (2003). Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. *Experimental Parasitology*, **104** (1-2): 33-39.

KOPECKY, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. (1999). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology*, **21**: 351.

KOVÁR, L.; KOPECKÝ, J.; RÍHOVÁ, B. (2002). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research*, **88** (12): 1066-1072.

KURIMOTO, I.; STREILEIN, J.W. (1992). Deleterious effects of cis-urocanic acid and UVB radiation on Langerhans cells and on induction of contact hypersensitivity are mediated by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Investigative Dermatology,* **99**: 69-70.

LALTOO, H.; VAN ZOOST, T.; KIND, L.S. (1979). IgE antibody response to mite antigens in mite infested mice. *Immunology Communications*, **8** (1): 1-9.

LANCASTER, J.L.; MEISCH, M.V. (1986). Arthropods in livestock and poultry production. Ed. Ellis Herwood Ltd., 230-239.

LAPAGE, G. (1968). Veterinary Parasitology. Oliver and Boyd Edit., Edimburgo-Londres: 511-524.

LECROISEY, A.; BOULARD, C.; KEIL, B. (1979). Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *European Journal of Biochemistry*, **101**: 385-393.

LECROISEY, A.; TONG, N.T.; KEIL, B. (1983). Hypodermin B a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with Hypodermin A and *Hypoderma* collagenase, two serine proteases from the same source. *European Journal of Biochemistry*, **134**: 261-267.

LECROISEY, A.; KEIL, B. (1985). Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *European Journal of Biochemistry*, **152**: 123-130.

LECROISEY, A.; GILLES, A.M.; DE WOLF, A.; KEIL, B. (1987). Complete aminoacid secuence of the colagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**: 7546-7551.

LEVASSEUR, G. (1991) Incidents dus à *Hypoderma lineatum*, lors du traitement précoce du varron. *Bulletin des G.T.V.,* **6B** (410): 189-191.

LIEW, F.Y.; DHALIWAL, J.S. (1987). Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from *Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites. *Journal of Immunology*, **138** (12): 4450-4456.

LIEW, F.Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. (1990). Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis*. Immunology*, **69** (4): 570-573.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C.A. (1993). Immunology of leishmaniasis. *Advanced Parasitology,* **32**: 161-259.

LONG, M.T.; BASZLER, T.V.; (2000). Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. *Journal of Immunology*, **164** (9): 4768-4774.

LONNEUX, J.F.; LOSSON, B.; POUPLARD, L. (1991). Donnés récentes sur l'hypodermose bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **135**: 7-14.

LONNEUX, J.F.; LOSSON, B.J. (1994). The efficacy of moxidectin 0,5% pour-on against *Hypoderma bovis* in naturally infected cattle: parasitological and serological data. *Veterinary Parasitology*, **52**: 313-320.

LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; BRAVO, A.; DÍEZ, P.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P. (1999a). Cambios histopatológicos en la submucosa esofágica de bovinos infestados por *Hypoderma lineatum*. *VI Congreso Ibérico de Parasitología. Córdoba*, 21-24 de septiembre.

LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; BRAVO, A.; DÍEZ, P. (1999b). Estudio anatomopatológico del tejido subcutáneo en bovinos infestados por *Hypoderma* spp. VI Congreso Ibérico de Parasitología. Córdoba, 21-24 de septiembre.

LÓPEZ-GATIUS, F.; ALMERÍA, S.; DONOFRIO, G.; NOGAREDA, C.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.L.; PABÓN, M.; DE SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. (2007). Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology*, **68** (7): 1067-1073

MACKAY, C.R. (1992). Migration pathways and immunologic memory among T lymphocytes. *Seminars Immunology*, **4** (1): 51-58.

MAGAT, A.; BOULARD, C. (1970). Essais de vaccination contre l'hypodermose bovine avec une vaccine contenant une collagénase brute extradite des larves de 1er stade *d'Hypoderma lineatum*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, Paris, **270**: 728-730.

MARCATO, A. (1990). *Anatomía e histología patológica especial de los mamiferos domésticos*. McGraw Hill, Madrid, 2ª edición.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; HERNANDEZ, S.; MORENO, T. (1988). Hipodermosis: Etiología. *Bovis (Tratado de medicina veterinaria)*, **25**: 35-54.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; GASCA-ARROYO, A.; DE JUAN, F.; HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. (1991). Maternal anti-Hypoderma antibodies in calves. *Medical and Veterinary Entomology*, **5** (3): 381-383.

MARTÍNEZ-MORENO, F.J. (1992). *Estudio inmunológico de la hipodermosis bovina.* Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, 109 pp.

MBOW, M.L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. (1994). Infiltration of CD4+ CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, antigens, IL-1 alpha and TNF-alpha in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology*, **82** (4): 596-602.

MCELROY, M.C.; BASSETT, H.F.; MONAGHAN, M.L.; DAVIS, W.C. (1998). The distribution of lymphocyte subsets in normal ovine skin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **62** (1): 65-71.

MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K.H. (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis. The Journal of Experimental Medicine.* **195**(2): 221-231.

MCLAREN, D.J.; WORMS, M.J.; ASKENASE, P.W. (1983). Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of *Rhipicephalus appendiculatus* larval feeding sites in actively sensitised guinea pigs and recipients of immune serum. *Journal of Pathology*, **139** (3): 291-308.

MENARD, L.C.; MINNS, L.A.; DARCHE, S.; MIELCARZ, D.W.; FOUREAU, D.M.; ROOS, D.; DZIERSZINSKI, F.; KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. (2007). B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. *Journal of Immunology*, **179**: 4857-4866.

MILLER, R.; WEN, X.; DUNFORD, B.; WANG, X.; SUZUKI, Y. (2006). Cytokine production of CD8+ immune T cells but not of CD4+ T cells from *Toxoplasma gondii*-infected mice is polarized to a type 1 response following stimulation with tachyzoite-infected macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **26**: 787-792.

MILNES, A.S.; BAILEY, M.; KNOWLES, T.G.; COLES, G.C.; GREEN, L.E.; DAY, M.J. (2007). An immunohistochemical assessment of the cutaneous immune response to louse infestation in cattle. *Journal of Comparative Pathology,* **136** (4): 240-249.

MINÁR, J.; BREEV, K.A. (1982). Laboratory and field rearing of the warble fly *Hypoderma bovis* (De Geer) (Diptera, hypodermatidae) in the research of its population ecology. *Folia Parasitologica*, **29** (4): 351-360.

MOIRÉ, N.; BIGOT, Y.; PERIQUET, G.; BOULARD, C. (1994). Sequencing and gene expression of hypodermins A, B, C in larval stages of *Hypoderma lineatum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **66**: 233-240.

MOIRÉ, N.; NICOLAS-GAULARD, I.; LE VERN, Y.; BOULARD, C. (1997). Enzymatic effect of hypodermin A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens. *Parasite Immunology*, **19**: 21–27.

MORRONDO, P. (1998). Estudio sobre la hipodermosis bovina en Galicia mediante determinación sérica de anticuerpos frente a hipodermina C. Memoria de Licenciatura**.** Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 106 pp.

MORRONDO, P.; DÍEZ, N.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, P.; PANADERO, R. (1999). Estudio inmuno-epidemiológico de la hipodermosis bovina en Galicia. *Producción Animal, **143***: 31-43.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology,* **136** (7): 2348-2357.

MOSMANN, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology*, **56**: 1-26.

MÜLLER, I.; KROPF, P.; LOUIS, J.A.; MILON, G. (1994). Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, **62**: 2575-2581.

MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. (1992). Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *Journal of Immunology*, **148** (6): 1858-1863.

NASH, A.D.; EGAN, P.J.; KIMPTON, W.; ELHAY, M.J.; BOWLES, V.M. (1996). Local cell traffic and cytokine production associated with ectoparasite infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **54** (1-4): 269-279.

NAVARRETE, I.; REINA, D.; HERNANDEZ, S.; MARTINEZ-GOMEZ, F.J.; GALEANO, C. (1993). Preliminary studies on bovine Hypodermosis in the province of Cáceres (Spain). Editado por: LOSSON, B.; LONNEUX, J.F.; PITHAN, K. Improvementes in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats, Commision of the European Communities, Liege, 3-11.

NELSON, W.A.; WEINTRAUB, J. (1972). *Hypoderma lineatum (De Vill.)* (Diptera: Oestridae): Invasion of the bovine skin by newly hatched larvae. *Journal of Parasitology*, **58** (3): 614-624.

NELSON, W.A.; KOBUB, G.C. (1980). *Melophagus ovinus* (Diptera: Hippoboscidae): evidence of local mediation in acquired resistance of sheep to keds. *Journal of Medical Entomology*, **17**: 291–297.

NELSON, W.A. (1987). Immune responses in Parasitic Infections, *Protozoa, Arthopods and Invertebrates.* Ed. Soulsby C.R.C. Press, Boca Ratón, **4**: 175-209.

NGUYEN, V.K.; BOURGES, N.; CONCORDET, D.; DORCHIES, P. (1996). Mast cells and eosinophils of the respiratory mucosa of sheep with *Oestrus ovis* (Linné, 1761) infection. *Parasite*, **3** (3): 217-221.

NGUYEN, V.K.; JACQUIET, P.; DURANTON, C.; BERGEAUD, J.P.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. (1999). Reactions of cells of nasal and sinusoidal mucosa of goats and sheep naturally infected by *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Parasite*, **6** (2): 141-149.

NICOLAS-GAULARD, I.; MOIRÉ, N.; BOULARD, C. (1995). Effect of the parasite enzyme, hypodermin A, on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. *Immunology,* **84**: 160–164.

NILSSEN, A.C.; ANDERSON, J.R. (1995). Flight capacity of the reindeer warble fly, *Hypoderma tarandi* (L.) and the reindeer nose bot fly, *Cephenemia trompe* (Modeer) (Diptera: Oestridae). *Canadian Journal of Zoology*, ***73***: 1228-1238.

OKUNEV, A.M. (1990). Ocurrence of larvae of *Fannia* flies in the prepupa of *Hypoderma bovis*. *Parazitologiya*, **24** (5): 417-419.

OLIVEIRA-SEQUEIRA ,T.C.; SEQUEIRA, J.L.; SCHMITT, F.L.; DE LELLO, E. (1996). Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **10** (4): 323-330.

OTRANTO, D.; TARSITANO, E.; GIANGASPERO, A.; PUCCINI, V. (2000). Differentiation by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism of some *Oestridae* larvae causing myiasis. *Veterinary Parasitology*, **90** (4): 305-313.

OTRANTO, D. (2001). The immunology of myasis: parasite survival and host defense strategies. *Trends in Parasitology*, **17** (4): 176-182.

OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; TARSITANO, E.; STEVENS, J.; (2003). Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).*Veterinary Parasitology*, **112** (3): 197-201.

OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; COLWELL, D.D.; GUAN, G.; GIANGASPERO, A.; BOULARD, C.; YIN, H. (2004). A third species of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) affecting cattle and yaks in China: molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology,* **90** (5): 958-965.

OTRANTO, D.; COLWELL, D.D. (2005). *Hypoderma sinense*: a debated issue. *Veterinary Parasitology*, **128** (3-4): 353-354.

OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; MILILLO, P.; DE LUCA, F.; STEVENS, J. (2005). Utility of mitochondrial and ribosomal genes for differentiation and phylogenesis of species of gastrointestinal bot flies. *Journal of Economic Entomology*, **98** (6): 2235-2245.

OZAKI, K.; LEONARD, W.J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (33): 29355-29358.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P. (1993). Variaciones anuales de la respuesta inmune en hipodermosis bovina. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1** (2): 102.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (1994a). Seroprevalence of *Hypoderma lineatum* (De Villiers, 1789) detected by indirect ELISA on cattle in Lugo province (N.W. Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, **54** (2): 129-132.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; CARRILLO, E.B.; PAZ, A. (1994b). Relación entre el número de larvas de *Hypoderma* spp en el dorso y la respuesta detectada por ELISA. *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles,* Sitges, 100.

PANADERO, R. (1996). Estudio epidemiológico y de la respuesta inmune frente a antígeno de *Hypoderma lineatum* como aportación a la lucha contra la hipodermosis bovina en Galicia. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, 256 pp.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; MEZO, M.; MORRONDO, P.; DÍEZ- BAÑOS, P. (1997). Effect of early treatment with ivermectin and doramectin on the dinamics of antibody response in cattle naturally infested by *Hypoderma lineatum* and *H. bovis. Veterinary Parasitology*, **73**: 325-334.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PAZ, A.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P. (1998). Estudio sobre el desarrollo de las larvas esofágicas de *Hypoderma lineatum* y su relación con el tratamiento precoz de la hipodermosis bovina en el Norte de España. *Veterinaria México*, **29**: 155-160.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, N.; PAZ, A.; DÍEZ, P.; MORRONDO, P. (2000). Influence of internal and environmental factors on the distribution and occurrence of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) in cattle in Galicia (northwest of Spain). *Medical and Veterinary Entomology*, **37** (1): 27-28.

PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PAZ, A.; DÍEZ-BAÑOS, N.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2001). Dynamics of the antibody response in cattle infested by *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) after a treatment with injectable and pour-on ivermectin. *Journal of Medical Entomology*, **38** (4): 603-605.

PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, L.; LÓPEZ, C.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2007). Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, **21** (3): 225-230.

PANADERO, R.; DACAL, V.; LÓPEZ, C.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2009). Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: in vitro effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. *Parasite Immunology*, **31** (2): 72-77.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; JOHNSON, E.M.; WHITENACK, D.L. (1993). Eosinophilic mediastinitis, myositis, pleuritis, and pneumonia of cattle associated with migration of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**: 226-231.

PATTERSON, P.S.; BOSSHARDT, S.C.; UDHAYUKUMAR, U.; XIAO, L.; KIDD, M.; HUNTER, R.L.; LAL, A.A. (1999). Prolonged expression of interferon gamma induced by protective blood stage immunization against *Plasmodium yoelii* malaria. *Vaccine*, **18**: 173-180.

PECINALI, N.R.; GOMES, R.N.; AMENDOEIRA, F.C.; PEREIRA-BOSTOS, A.C.M.; MARTINS, M.J.Q.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. (2005). Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Veterinary Parasitology*, **134**: 121-130.

PETITHORY, J.; BOULARD, C. (1979). Étude comparative des antigènes *H. bovis* et *H. lineatum* dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **9** (7): 393-396.

PFADT, R.E. (1947). Effect of temperature and humidity on larval and pupal stages of the common cattle grub. *Journal of Economic Entomology*, **40**: 293-300.

PFADT, R.E.; LLOYD, J.E.; SHARAFI, G. (1975). Pupal development of cattle grubs at constant and alternating temperatures. *Journal of Economic Entomology*, **68** (3): 325-328.

PFEFFER, A.; WILSON, J.A.; PERNTHANER, A. (2007). Changes in morphology and key cytokine gene expression after intradermal injection of louse (*Bovicola ovis*) antigen in sheep with naturally occurring atopic dermatitis. *Journal of Comparative Pathology*, **136**: 36-48.

PIVARCSI, A.; NAGY, I.; KORECK, A.; KIS, K.; KENDERESSY-SZABO, A.; SZELL, M.; DOBOZY, A.; KEMENY, L. (2005). Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes and Infection*, **7**(9-10): 1117-1127.

POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, boold leucocyte pattern and lymphocyte subset in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica. Veterinary Parasitology*, **49**: 179-190.

PRIETO, M.; ESPI, M.; GARCIA, J.A.; PARRA, F. (1990). Effect of Ivermectin treatment on anty-hypodermin C Asturiana cattle naturally with *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **35**: 211-218.

PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1984). Induction of intradermal skin reactions in the bovine by fractionated proteins of *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **16**: 137-146.

PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1985). Kinetic development of humoral anty-*Hypoderma lineatum* antibody activity in the serum of vaccinated and infested cattle. *Southwest Entomology*, **10**: 39-48.

PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C; FISHER, W.F. (1987). Kinetic development of serum antibody to purified *Hypoderma lineatum* proteins in vaccinated and non-vaccinated cattle. *Southwest Entomology*, **12** (2): 79-88.

PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B.; BURKETT, B.K. (1988). Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. *Veterinary Parasitology*, **29**: 53-63.

PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1989). Calostral transfer of antibodies specific for *Hypoderma lineatum* proteins. *Veterinary Research Communications*, **13** (3): 213-223.

PRUETT, J.H.; FISHER, W.F.; DELOACH, J.R. (1989). Dexamethasone-induced bovine T-lymphocyte suppression and the effect upon susceptibility to sheep scab mite (Acari: Psoroptidae) infestation. *Journal of Economic Entomology*, **82** (1): 175-179.

PRUETT, J.H. (1993). Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermin A, a serine protease of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Parasitology*, **79** (6): 829-833.

PRUETT, J.H.; KUNZ, S.E. (1996). Thermal requirements for *Hypoderma lineatum* (Diptera:Oestridae) egg development. *Journal of Medical Entomology*, **33**: 976-978.

PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B.; FISHER, W.F.; BEETHAM, P.K.; KUNZ, S.E. (1998). Evaluation of natural *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae) soluble proteins as candidate vaccine immunogens. *Journal of Medical Entomology*, **35** (5): 861-871.

QUINTERO-MARTÍNEZ, M.T.; NEGRETE, J.O.; BENÍTEZ, R.; MÉNDEZ, M.A.; JUÁREZ VEGA, G.; CRUZ-VÁZQUEZ, C. (2007). Presence of *Hypoderma lineatum* stage I larvae in the esophagus of cattle slaughtered in Chihuahua, Chih., Mexico. *Veterinary Parasitology*, **146** (1-2): 189-191.

RAMACHANDRA, R.N.; WIKEL, S.K. (1995). Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *Journal of Medical Entomology*, **32** (3): 338-345.

REINA, D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; MOLINA, J.M.; HERNANDEZ, S. (1994). Present status of warble fly in Extremadura (South-West of Spain). Editado por: PFISTER, K.; CHARBON, J.L.; TARRY, D.W.; PITHAN, K. En: *Improvements in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats*. Comisión Europea, Thun: 59-64.

ROBERTSON, R.H. (1980). Antibody production in cattle infected with *Hypoderma* spp. *Canadian Journal of Zoology*, **58**: 245-251.

ROMANIUK, A. (1974). Neurochemical bases of defensive behavior in animals. *Acta of Experimental Neurobiology*, **34**: 205-214.

ROSA, A.B.; MOSCHINI, G. (1988). Psoroptic mange in sheep. Histopathology of the skin in acute and chronic cases. *Veterinaria Argentina,* **49**: 771-774.

ROSBOTTOM, A.; GUY, C.S.; GIBNEY, E.H.; SMITH, R.F.; VALARCHER, J.F.; TAYLOR, G.; WILLIAMS, D.J. (2007). Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, **29** (4): 219-228.

ROVERE, R.J.; NUNEZ, J.L. (1977). Psoroptic mange in sheep. Histopathological study of the skin in acute and chronic cases. *Gaceta Veterinaria*, **39**: 172-177

ROZENFIELD, C.; MARTINEZ, R.; SEABRA, S.; SANT-ANNA, C.; GONÇALVES, J.G.R.; BOZZA, M.; MOURA-NETO, V.; DE SOUZA, W. (2005). *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric-oxide, synthase and transforming growth factor B1 production by infected microglia. *American Journal of Pathology*, **167**: 1021-1031.

RUIZ, P. (1982). Contribución al estudio de la hipodermosis en la provincia de Córdoba. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

SALMON, S.E.; CROWLEY, J.J.; GROGAN, T.M.; FINLEY, P.; PUGH, R.P.; BARLOGIE, B. (1994). Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alfa in the treatment of multiple myeloma: a Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology,* **12** (11): 2405-2414.

SCALES, H.E.; IERNA, M.X.; LAWRENCE, C.E. (2007). The role of IL-4, IL-13 and IL-4 R alpha in the development of protective and pathological responses to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunology*, **29** (2): 81-91.

SCHARFF, D.K. (1950). Cattle grubs, their biologies, their disribution and experiments in their control. *Technical Bulletin Montana State College, Agriculture Experimental Station,* 471.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. (1995). IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **154**: 5320-5330.

SCHNITTGER, L.; HOLLMANN, C.; DIEMER, U.; BOGUSLAWSKI, K.; AHMED, J.S. (2000). Proliferation and cytokine profile of *T. annulata*-infected ovine, caprine, and bovine lymphoblastoid cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **916**: 676-680.

SCHOLL, P.J.; BARRETT, C.C. (1986). Technique to extract *Hypoderma* sp. (Diptera:Oestridae) larvae from the backs of cattle. *Journal of Economic Entomology*, **79**: 1125-1126.

SCHOLL, P.J.; WEINTRAUB, J. (1988). Gonotrophic development in *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae) with notes on reproductive capacity. *Annals of the Entomological Society of America*, **81**: 315-324.

SCHOLL, P.J.; SCHWINGHAMMER, K.A.; CHAMBERLAIN, W.F. (1989). Technique for age-grading late third-instar *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **26** (3): 230-233.

SCHOLL, P.J. (1990). A review of parasites, pathogens, and predators of cattle grubs. *The Southwestern Entomology*, **15**: 360-365.

SCHWINGHAMMER, K.A.; PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1988). Biochemical and immunological properties of HPLC peak 2 and ion exchange fraction of common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **81**: 549-554.

SERGENT, G. (1941). Sur le rôle pathogène possible des larves d'*hypoderma bovis* au cours de leur migration chez les bovides. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire Française,* **94**: 103-107.

SHEAHAN, B.J. (1975). Pathology of *Sarcoptes scabiei* infection in pigs.1. Naturally occurring and experimentally induced lesions. *Journal of Comparative Pathology*, **85**: 87-95.

SHER, A. (1992). Schistosomiasis. Parasitizing the cytokine system. *Nature*, **356** (6370): 565-566.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. (1999). Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Pathology*, **36** (4): 321-327.

SHU, D.; PFEFFER, A.; PERNTHANER, A. (2009). Cutaneous cytokine gene expression and cellular responses in lambs infested with the louse, *Bovicola ovis*, and following intradermal injection of crude louse antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **129** (1-2): 82-92.

SIMMONS, S.W. (1937). Some histopathological changes caused by the larvae in the esophagus of cattle. *Journal of Parasitology,* **23**: 376-381.

SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Hypoderma bovis* in cattle. *Research in Veterinary Science*, **34**: 251.

SINCLAIR, I.J.; TARRY, D.W.; WASSALL, D.A. (1984). Persistence of antibody in calves after an infection with *Hypoderma bovis*. *Research in Veterinary Science*, **37**: 383-384.

SOLOPOV, N.V. (1988). Features of the ecology of juvenile forms of subcutaneous gadfly in reindeer. *Soviet Journal of Ecology*, **19** (5): 299-304. (Review of Medical and Veterinary Entomology, 1990).

STROMBERG, P.C.; FISHER, W.F. (1986). Dermatopathology and immunity in experimental *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) infestation of naive and previously exposed Hereford cattle. *American Journal of Veterinary Research*, **47** (7): 1551-1560.

SUK, K.; SOMERS, S.D.; ERICKSON, K.L. (1993). Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology*, **80** (4): 617-624.

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL GIUDICE, G.; AGUET, M.; LOUIS, J.A. (1995). Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *The Journal of Experimental Medicine*, **181**: 961-971.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of Experimental Medicine,* **177**: 1797-1802.

TABOURET, G.; LACROUX, C.; ANDREOLETTI, O.; BERGEAUD, J.P.; HAILU-TOLOSA, Y. HOSTE, H.; PREVO,T.F.; GRISEZ, C.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, **34** (2): 231-241

TALEGON, F. (1969). Estudios sobre la hipodermosis bovina. Ministerio de Agricultura. Madrid, 197 pp.

TARLETON, R.L. (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *Journal of Immunology*, **140** (8): 2769-2773.

TARRY, D.W. (1980). Warble fly infestation and climate. *The Veterinary Record*, **106**: 559-560.

TARRY, D.W. (1981). Distribution of cattle warble flies in Britain. *The Veterinary Record*, **108**: 69-72.

TEIXEIRA, L.; MARQUES, A.; MEIRELES, C.S.; SEABRA, A.R.; RODRIGUES, D.; MODUREIRA, P.; FAUSTINO, A.; SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J.M.; CANADA, N.; VILANOVA, M. (2005). Characterization of the B cell inmune response elicited in BALB/c mice challenged with *Neospora caninum* tachyzoites. *Immunology*, **116**: 38.

TEMEYER, K.B.; PRUETT, J.H. (1990). Preparation of biologically active messenger RNA from larvae of the common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **83** (1): 55-58.

THOUVENIN, M.; CANDOLFI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; KIEN, T. (1997). Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2 dependent. *Parassitología*, **39**: 279-283.

TONG, N.T.; IMHOFF, J.M.; LECROISEY, A.; KEIL, B. (1981). Hypodermin A a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochemical and Biophysical Acta*, **658**: 209-219.

TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BARERA, A.; DIELI, F.; SIRECI, G.; GENCHI, C.; DEPLAZES, P.; SALERNO, A. (2005). *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN-γ production in pregnant dogs and their puppies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**: 247-251.

VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.; BATES, P.; GROVES, B.; MILLER, H.R. (2000). Cutaneous and systemic responses during primary and challenge infestations of sheep with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunology,* **22**: 407–414.

VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F. (2003). Sheep scab: the disease, pathogenesis and control. *Journal of Comparative Pathology*, **128**: 79–91.

VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F.; HALLIWELL, R.E.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.; MILLER, H.R. (2003). Cutaneous hypersensitivity reactions to *Psoroptes ovis* and Der p 1 in sheep previously infested with *P. ovis* the sheep scab mite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **91** (2): 105-117.

VAN DEN BROEK, A.H.; ELSE, R.W.; HUNTLEY, J.F.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.A.; MILLER, H.R. (2004). Early innate and longer-term adaptive cutaneous immunoinflammatory responses during primary infestation with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Journal of Comparative Pathology*, **131** (4): 318-329.

VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F.; MACKELLAR, A.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.A.; MILLER, H.R. (2005). Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis,* the sheep scab mite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **105** (1-2): 141-150.

WANG, Z.Q.; HAN, H.M.; CUI, J. (2005). Preliminary study on congenital transmission of *Trichinella spiralis* in mice. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases,* **23**: 73-77.

WATSON, D.L.; COLDITZ, I.G.; ANDREW, M.; GILL, H.S.; ALTMAN, K.G. (1994). Age-dependent immune response in Merino sheep. *Research in Veterinary Science*, **57**: 152–158.

WEI, Q.K.; LI, J.; FU, T.X.; BAI, X.L.; CUI, Y.; ZHANG, D.B.; WANG, H.F.; LIU, Y.B.; FU, B.; ZAI, D.F.; HUANG, B.C.; LIU, K.Y.; HAN, G.D. (2006). Studies on the immuno-protection of ROP2 nuclei acid vaccine in *Toxoplasma gondii* infection. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases,* **24**: 337-341.

WEBSTER, K.A. (1998). Immunodiagnosis. Editado por: BOULARD, C.; O´BRIEN, D.; PITHAN, K.; SAMPIMON, O.; SOL, J.; WEBSTER, K. En: *Improvements in control methods for Warble-fly in farm livestock*. COST 811. Comisión Europea. Bruselas.

WEINTRAUB, J. (1961). Inducing mating and oviposition of the warble flies *Hypoderma bovis* (L.) and *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae) in captivity. *Canadian Entomology*, **93**: 149-156.

WEINTRAUB, J.; McGREGOR, W.S.; BRUNDETT, H.M. (1961). Artificial infestation of the northern cattle grub *Hypoderma bovis* in Texas. *Journal of Economic Entomology*, **54**: 84.

WEINTRAUB, J.; ROBERTSON, R.H.; GOODING, R.H. (1968). Experiments in hybridizing the warbles flies *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Canadian Journal of Zoology*, **46**: 129-133.

WIKEL, S.K.; ALLEN, J.R. (1976). Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, **30** (3): 311-316.

WIKEL, S.K. (1984). Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation an overview. *Veterinary Parasitology*, **14** (3-4): 321-339.

WIKIL, S.K.; OSBURN, R.L. (1982). Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* **76** (4): 405-414.

WILSON, D.C.; MATTHEWS, S.; YAP, G.S. (2008). IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *Journal of Immunology*, **180**: 5935-5945.

WOLFE, L.S. (1959). Observations on the histopatological changes caused by the larvae of *Hypoderma bovis* (L.) and *Hypoderma lineatum* (de Vill.) (Diptera: Oestridae) in tissues of cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, **39**: 145-157.

YACOB, H.T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P.; BLEUART, C.; PREVOT, F.; GRISEZ, C.; BERGEAUD, J.P.; HOSTE, H. (2004). Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by a subsequent infection with *Oestrus ovis*. *Veterinary Parasitology*, **121** (3-4): 297-306.

YAMOV, V.Z.; SOLOPOV, N.V.; RAABE, I.Y. (1990). *Hypoderma diana* (Hypodermatidae) from maral deer in the Altai. *Parazitologiya*, **24** (4): 289-295. (Review of Medical and *Veterinary Entomology*, 1991).

ZHANG, W.Y.; MOREAU, E.; HOPE, J.C.; HOWARD, C.J.; HUANG, W.Y.; CHAUVIN, A. (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, **111**: 154-159.

ZINTL, A.; GRAY, J.S.; SKERRETT, H.E.; MULCAHY, G. (2005). Possible mechanism under lying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunology*, **27**: 115.

ZUMPT, F. (1965). Myasis in man and animals in the old world. Ed. Butterworths, Londres: 205-229.